

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**

VOLUME 12

1963
TRIMESTRIEL

NUMÉRO 1

18 JUIN 1963



**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE**

AVIS AUX LECTEURS

Les Annales publiées par l'I. N. R. A. comportent les huit séries suivantes :

ANNALES AGRONOMIQUES. — Agronomie générale et science du sol. — 6 fascicules par an.

ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — 4 fascicules par an.

ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES. — 4 fascicules par an.

ANNALES DES ÉPIPHYTIES. — Pathologie végétale, zoologie agricole, phytopharmacie. — 4 fascicules par an.

ANNALES DE L'ABEILLE. — 4 fascicules par an.

ANNALES DE ZOOTECHNIE. — 4 fascicules par an.

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE. — 4 fascicules par an.

ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE. — 4 fascicules par an.

NUMÉROS HORS SÉRIE DES ANNALES :

Introduction à la documentation agronomique. La classification bibliographique, par D. Kervégant.

N° hors-série des Annales de l'INRA, 1962, 176 p.....	15,00 F
Franco	16,00 F

L'amélioration des plantes en France, par R. Mayer.

N° hors série des Annales de l'Amélioration des Plantes, 1962, 128 p.....	9,50 F
Franco	10,00 F

Variétés de fraisiers non remontantes inscrites au Catalogue des espèces et variétés. Leur détermination et leur description, par J. O. Brossier.

N° hors série des Annales de l'Amélioration des Plantes, 1962, 142 p.....	15,00 F
Franco	15,50 F

Étude génétique et cytogénétique des espèces *Lolium perenne* L., *Festuca pratensis* Huds et de leurs hybrides, par S. Essad.

N° hors série des Annales de l'Amélioration des Plantes, 1962, 103 p.....	9,50 F
Franco	10,00 F

Colloque sur les moyens de protection contre les espèces d'oiseaux commettant des dégâts en Agriculture, par J. Giban.

N° hors série des Annales des Épiphyties, 1962, 263 p.....	25,00 F
Franco	26,00 F

Les commandes doivent être adressées au Service des Publications, 149, rue de Grenelle, Paris-VII^e.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications, par virement postal à son compte courant : Paris 9064-43 ou par bons U. N. E. S. C. O.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE
ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE



Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique.

MÉTABOLISME DE L'ACIDE LACTIQUE PAR *ACETOBACTER RANCENS*

P. DUPUY et J. MAUGENET

Station de Technologie végétale, route de Saint-Cyr, Versailles (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

Jusqu'ici l'étude du métabolisme de l'acide lactique par *Acetobacter* a été réalisée au moyen de bactéries cultivées aux environs de la neutralité. A la suite des observations faites sur le cidre, on a cherché à vérifier si les bactéries cultivées en milieu acide se comportaient bien de la même façon.

Pour cela, on a réalisé des cultures à pH constant (3,8 et 6,0) et préparé d'une part des bactéries non proliférantes, d'autre part des extraits dépourvus de cellules séparés par centrifugation en extrait soluble et granules. Les activités de ces diverses fractions ont été déterminées par la méthode micromanométrique de WARBURG.

On a pu ainsi montrer qu'*Acetobacter rancens* peut donner, par oxydation du lactate, des produits différents : eau, gaz carbonique, acide acétique, éthanal, acétoïne, suivant les conditions dans lesquelles ont été cultivées les bactéries et les quantités d'oxygène dont elles peuvent disposer. Leur culture en milieu acide favorise la formation d'éthanal et ceci vient confirmer les observations faites dans le cidre contenant de l'acide lactique où le développement d'*Acetobacter* est toujours accompagné de production d'éthanal.

INTRODUCTION

L'oxydation de l'acide lactique constitue un test important pour la classification des *Acetobacter*. Le critère retenu est la formation de CO_2 à partir du lactate : toutes les espèces réalisent cette réaction à l'exception de celles appartenant au groupe *Suboxydans*. De LEY et SCHELL (1959) ont montré que le pyruvate et l'éthanal étaient des intermédiaires de ce métabolisme. Cette étude offre un intérêt biochimique et aussi un intérêt pratique, puisque l'un de nous a pu démontrer que dans le cidre la dégradation de l'acide lactique par *Acetobacter rancens* était à l'origine d'une altération désignée par les praticiens sous le nom de « maladie du framboisé » (MAUGENET, 1962).

I. — TECHNIQUES UTILISÉES

La souche employée (*Acetobacter rancens*) et les techniques utilisées sont identiques à celles déjà décrites dans un mémoire précédent (DUPUY et MAUGENET, 1962). En outre dans certains essais on a utilisé le tampon citrate-phosphate 0,2 M de Mac ILVAINE (1921).

Les déterminations des divers produits radioactifs sont faites en utilisant les méthodes suivantes :

- Le gaz carbonique piégé par la potasse contenue dans la cupule de la fiole de Warburg est précipité sous forme de carbonate de baryum.
- L'acide acétique est récupéré après distillation sous forme d'acétate de sodium.

Pour réduire les pertes on ajoute chaque fois que c'est nécessaire une certaine quantité de l'entraîneur non radioactif. Ces précipités recueillis sur filtre millipore sont montés sur des planchettes et leur radioactivité mesurée avec un compteur de GEIGER-MULLER à fenêtre mince. Les résultats ont été corrigés de l'auto-absorption.

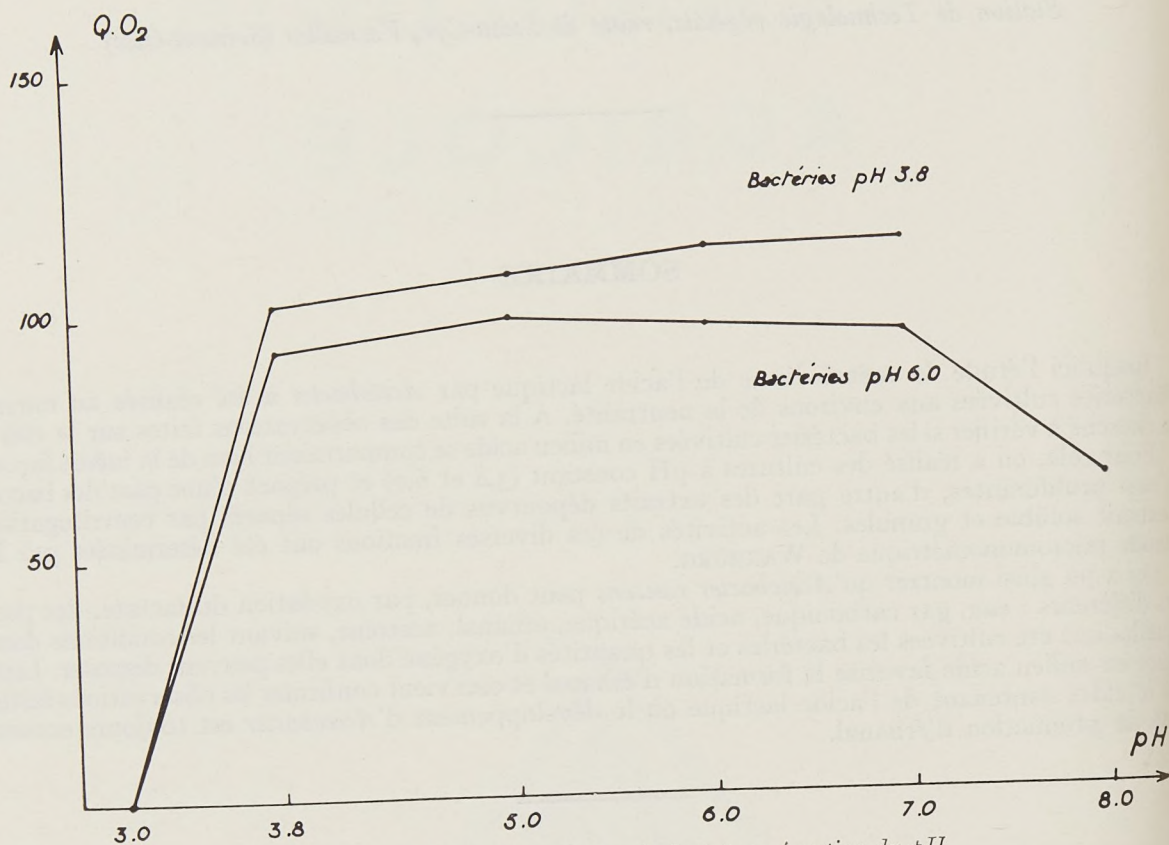


FIG. 1. — Vitesse d'oxydation du lactate en fonction du pH

Bactéries cultivées à pH 3,8 et à pH 6,0 ; Résultats exprimés en $\mu\text{l O}_2$ absorbés par heure à 30°C et pour 1 mg de poids sec (Q. O₂). D-lactate de Ca = 5 μmoles par fiole de Warburg. Tampons : Tris-tartrique 0,1 M de pH 3 à pH 5 ; Phosphate Na₂HPO₄ 0,1 M de pH 6 à pH 7 ; Tris-HCl 0,1 M à pH 8.

II. — RÉSULTATS

A) EXPÉRIENCES AVEC LES BACTÉRIES NON PROLIFÉRANTES

1°) Métabolisme aérobie du lactate

On a déterminé l'absorption d'oxygène avec l'appareil de Warburg, pour les bactéries non proliférantes placées en présence de D-lactate de Ca à divers pH. Les bactéries ont été essayées le jour même de leur récolte, pour se placer dans des conditions

tions identiques et faire une comparaison valable entre les bactéries cultivées à pH 3,8 et celles cultivées à pH 6,0.

Quel que soit le pH de culture des bactéries, on constate que l'oxydation du lactate se produit avec une vitesse voisine de l'optimum pour les pH compris entre 3,8 et 7. Les bactéries cultivées à pH 3,8 ont une intensité respiratoire un peu plus élevée que celles cultivées à pH 6,0 (fig. 1). Ce résultat est analogue à celui trouvé pour l'oxydation de l'éthanol qui présente même une zone de pH optimum encore plus large.

Nous avons d'autre part mesuré les échanges respiratoires en vue d'établir le rapport O_2/CO_2 . On constate dans le tableau 1 que ce rapport reste constant et

TABLEAU I

Métabolisme du D-lactate en aérobiose

	pH des mesures	Échanges respiratoires		
		O_2 absorbé	CO_2 dégagé	O_2/CO_2
Bactéries cultivées à pH 3,8	3,8	4,24	4,38	0,97
	6,0	6,43	6,65	0,97
Bactéries cultivées à pH 6,0	3,8	6,12	6,30	0,97
	6,0	6,92	7,10	0,97

Les chiffres expriment les quantités de O_2 absorbé et de CO_2 dégagé en μ mole et correspondent à l'oxydation de 3 μ mole de D-lactate de Ca.

Tampons Tris-tartrique 0,1M pour pH 3,8 ; phosphate Na-K 0,1 M pour pH 6,0.

voisin de l'unité au cours de l'oxydation du lactate. Cependant dans toutes les mesures on retrouve un léger excès de CO_2 dégagé par rapport à l' O_2 consommé. On remarque en outre, que les quantités de O_2 absorbé et de CO_2 dégagé ne correspondent pas à l'oxydation totale de 3 μ moles de D-lactate qui nécessiterait 9 μ moles de O_2 . D'après la courbe du dégagement de CO_2 et de l'absorption de O_2 (fig. 2) on voit que la réaction s'arrête brusquement avant que la totalité du substrat ne soit oxydée. Lorsque les bactéries sont cultivées à pH 3,8 et utilisées au même pH, on ne trouve que la moitié des molécules de CO_2 qui correspondraient à la disparition totale du substrat. Cependant le rapport O_2/CO_2 reste voisin de 1.

Nous avons fait le bilan de ce métabolisme avec du DL-lactate radioactif uniformément marqué sur le carbone, en vue de voir s'il restait du lactate une fois la réaction terminée et s'il se formait un autre composé. Pour cela nous avons utilisé des bactéries cultivées à pH 3,8 et analysé le contenu des fioles de Warburg lorsque l'oxydation était arrêtée.

Dans l'expérience réalisée à pH 6, on a contrôlé par chromatographie sur papier que le lactate avait disparu du milieu et qu'il ne s'était pas accumulé d'acide acétique en utilisant la réaction colorée de OONO (1952). La radioactivité introduite se retrouve pour 80 p. 100 sous forme de carbonate piégé par la potasse de la cupule

centrale. Le reste de l'activité et fixé dans les bactéries et ne peut pas être détaché par lavage prolongé à l'eau froide.

Lorsque l'oxydation se fait à pH 3,8 on observe aussi la disparition complète du lactate. Il reste cependant 20 p. 100 de la radioactivité totale dans le milieu, elle est due à l'acétate qui est facilement séparé par entraînement à la vapeur d'eau et

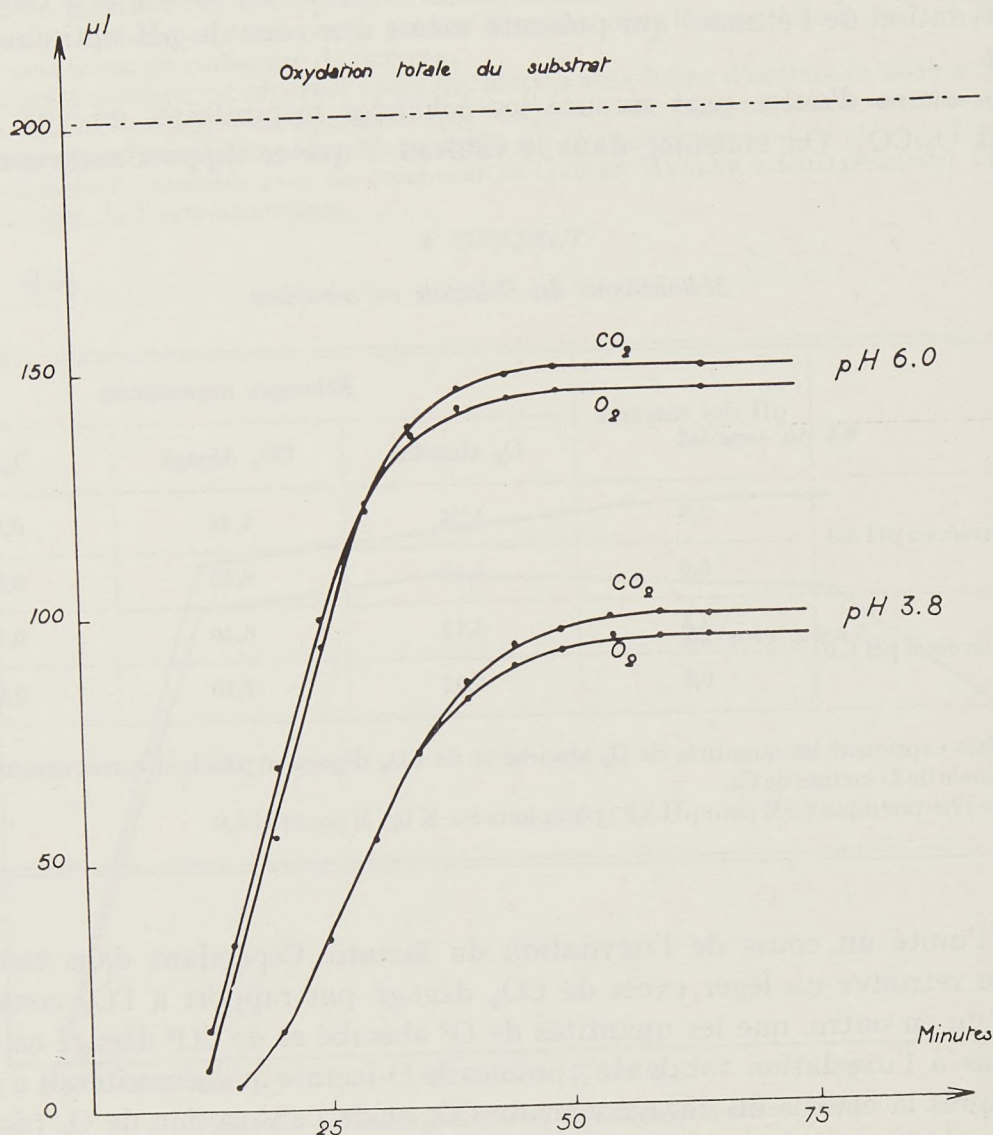


FIG. 2. — Oxydation du lactate à pH 3,8 et pH 6,0
Bactéries cultivées à pH 3,8. Par fiole de Warburg : 3,84 mg de bactéries et 3 μ moles de D-lactate de Ca
Tampons : Tris-tartrique 0,1 M pour pH 3,8 ; Phosphate Na-K 0,1 M pour pH 6,0.

compté sous forme d'acétate de sodium. Les corps bactériens renferment encore 6,5 p. 100 de la radioactivité ce qui représente une proportion plus faible que celle atteinte dans l'expérience faite à pH 6.

2^o) Métabolisme aérobie du pyruvate

Les échanges respiratoires ont été mesurés dans les mêmes conditions que pour l'oxydation du lactate et les résultats sont inclus dans le tableau 2. En outre nous avons indiqué sur la figure 3 la variation du rapport O_2/CO_2 au cours de la réaction.

TABLeAU 2
Métabolisme du pyruvate en aérobiose

	pH des mesures	Échanges respiratoires		
		O ₂ absorbé	CO ₂ dégagé	O ₂ /CO ₂
Bactéries cultivées à pH 3,8	3,8	1,47	3,06	0,48
	6,0	6,07	7,32	0,83
Bactéries cultivées à pH 6,0	3,8	1,65	3,12	0,53
	6,0	6,25	7,45	0,84

Les chiffres expriment les quantités de O₂ absorbé et de CO₂ dégagé en μ mole et correspondent à l'oxydation de 3 μ moles de pyruvate de Na.

Tampons : Tris-tartrique 0,1 M pour pH 3,8 ; phosphate Na-K 0,1 M pour pH 6,0.

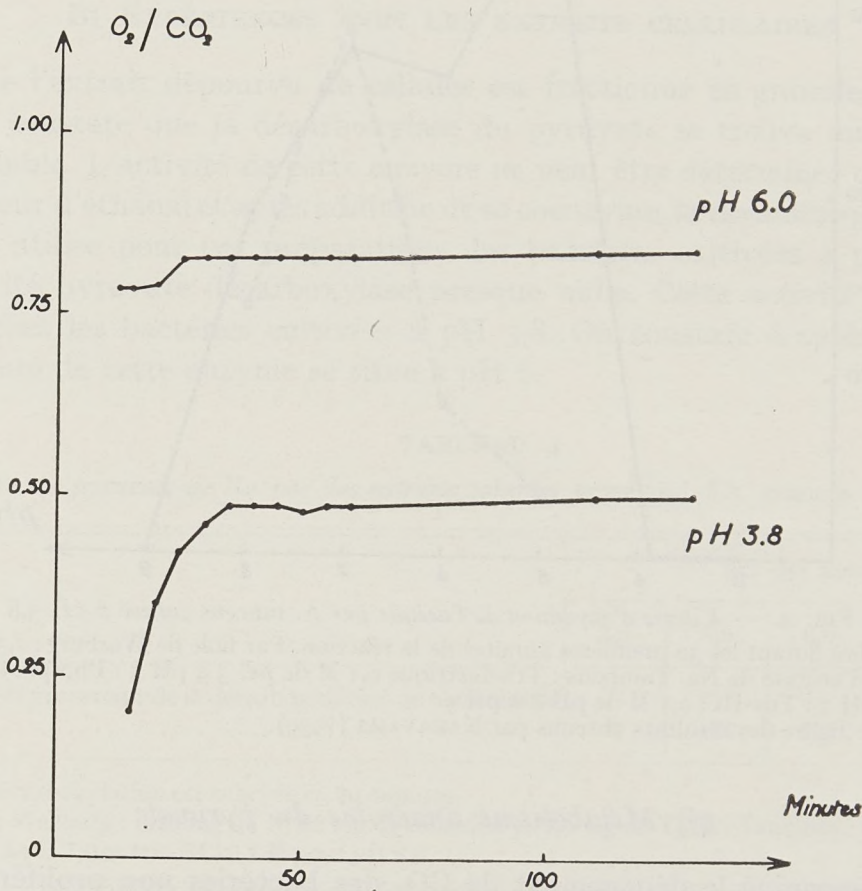


FIG. 3. — Variation du rapport O₂/CO₂ au cours de l'oxydation du pyruvate à pH 3,8 et pH 6,0
Bactéries cultivées à pH 3,8. Par fiole de Warburg : 3,84 mg de bactéries et 3 μ moles de pyruvate de Na.
Tampons : Tris-tartrique 0,1 M pour pH 3,8 ; Phosphate Na-K 0,1 M pour pH 6,0.

On peut constater qu'à pH 3,8 la décarboxylation du pyruvate précède l'oxydation de l'éthanal. Le rapport O₂/CO₂ d'abord nul tend vers 0,50 à la fin de la réaction. A pH 6,0 l'oxydation et la décarboxylation vont de pair au cours de la réaction et le rapport O²/CO² reste voisin de 0,84. Les résultats sont identiques quel que soit le pH de culture des bactéries, 3,8 ou 6,0.

3°) Oxydation de l'acétate

Nous avons mesuré l'oxydation de l'acétate par des bactéries cultivées à pH 3,8 et essayées à divers pH. Les résultats reproduits dans la figure 4 indiquent un optimum à pH 5 ; on a aussi indiqué sur cette figure les résultats obtenus par NAKAYAMA (1959) avec une souche d'*Acetobacter species* voisine de *A. suboxydans*. On constate que le pH optimum de l'oxydation de l'acétate est plus étroit que celui de l'éthanol et du lactate.

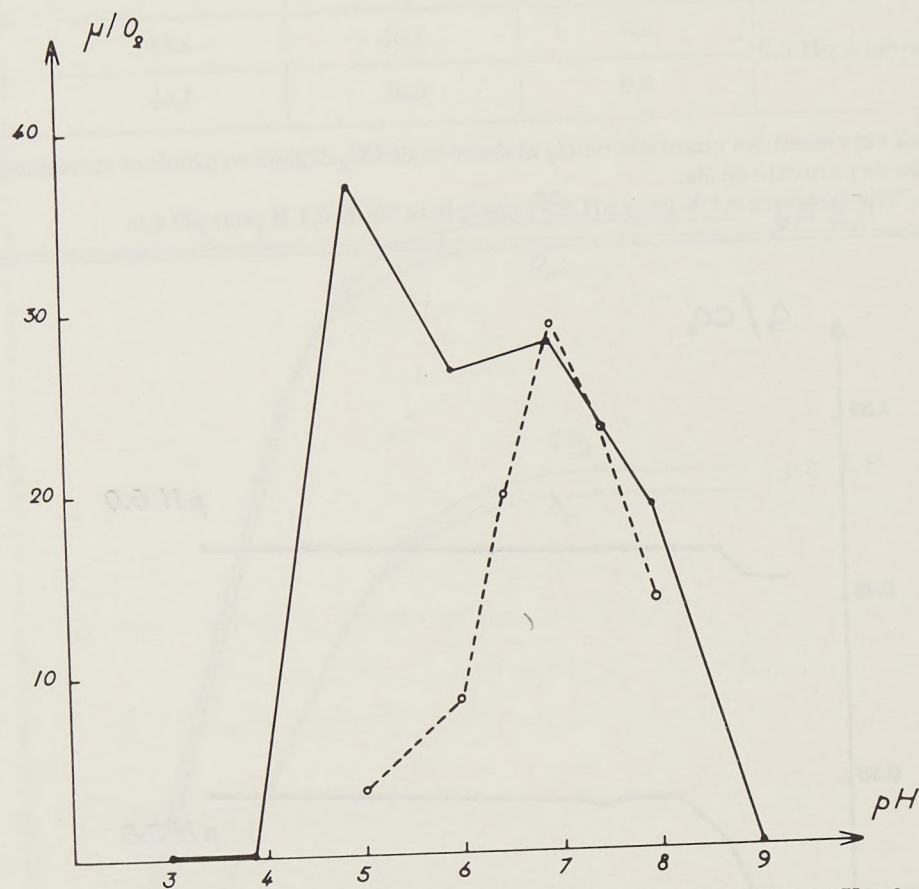


FIG. 4. — Vitesse d'oxydation de l'acétate par *A. rancens* cultivé à pH 3,8
 $\mu\text{l O}_2$ absorbés durant les 30 premières minutes de la réaction. Par fiole de Warburg : 2,30 mg de bactéries
 et 10 μmol d'acétate de Na. Tampons : Tris-tartrique 0,1 M de pH 3 à pH 5 ; Phosphate Na-K 0,1 M
 de pH 6 à pH 7 ; Tris-HCl 0,1 M de pH 8 à pH 9.
 En pointillé: figure des résultats obtenus par NAKAYAMA (1959).

4°) Métabolisme anaérobie du pyruvate

On a déterminé le dégagement de CO_2 des bactéries non proliférantes placées en présence de 6 μmol de pyruvate de Na et à divers pH dans du tampon de Mac ILVAINE (1921). Ces essais ont été faits en présence de dimédon comme accepteur d'éthanal.

En considérant le tableau 3, on remarque que les bactéries cultivées à pH 3,8 se montrent beaucoup plus aptes à décarboxyler le pyruvate que celles cultivées à pH 6,0. On voit que le pH optimum de la réaction correspond au pH de la culture et que l'activité optimum est 20 fois plus forte pour les bactéries cultivées à pH 3,8 que pour celles cultivées à pH 6,0.

TABLEAU 3

Vitesses de décarboxylation du pyruvate de Na par A. rancens cultivé à des pH différents

	pH des mesures					
	2,6	3,2	3,8	5,0	6,0	7,0
Q CO ₂ des bactéries cultivées à pH 3,8.....	41,4	105,7	127,6	80,0	66,9	44,1
Q CO ₂ des bactéries cultivées à pH 6,0.....	0,3	4,0	5,0	6,1	6,3	4,7

Résultats exprimés en μ l de CO₂ dégagés par heure à 30°C et pour 1 mg de poids sec (Q CO₂).
Pyruvate de Na : 6 μ moles par fiole de Warburg.
Bactéries cultivées à pH 3,8 : 2,3 mg par fiole, bactéries cultivées à pH 6,0 : 30 mg par fiole.
Tampon : citrate-phosphate 0,1 M.

B) EXPÉRIENCES AVEC LES EXTRAITS CELLULAIRES

Lorsque l'extrait dépourvu de cellules est fractionné en granules et en parties soluble, on constate que la décarboxylase du pyruvate se trouve uniquement dans la partie soluble. L'activité de cette enzyme ne peut être déterminée qu'en présence d'un accepteur d'éthanal et après addition de sa coenzyme, la thiamine pyrophosphate

Si l'on utilise pour ces préparations des bactéries cultivées à pH 6 l'extrait a une activité pyruvate décarboxylase presque nulle. Cette activité est beaucoup plus forte chez les bactéries cultivées à pH 3,8. On constate d'après le tableau 4 que l'optimum de cette enzyme se situe à pH 6.

TABLEAU 4

Décarboxylation du pyruvate de Na par des extraits solubles provenant d'A. rancens cultivé à pH 3,8.

	pH des mesures				
	3,8	5,0	6,0	7,0	8,0
μ l de CO ₂ dégagés provenant de la décarboxylation de 6 μ moles de pyruvate	0	124	129	120	95

A 30°C la décarboxylation est achevée en 30 minutes.
Par fiole de Warburg : 0,23 mg de N, 25 mg de dimédon et 0,5 mg de ThPP. Tampons : citrate-phosphate 0,1 M de pH 3,8 à pH 7,0 et tris-HCl 0,1 M pour pH 8,0.

III. — DISCUSSION

Assimilation du substrat par les bactéries non proliférantes

Il est surprenant de constater que les bactéries non proliférantes, même lorsqu'elles sont préparées avec soin, assimilent une fraction importante du substrat.

Les expériences de De LEY (1958 et 1959) et de De LEY et SCHELL (1958 et 1959)

montrent aussi que les *Acetobacter* ne sont pas capables de fixer tout l'oxygène qui serait nécessaire à l'oxydation complète du substrat introduit. Les résultats obtenus par ces auteurs sont reproduits à côté des nôtres dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Oxygène absorbé par diverses souches d'Acetobacter mises en présence de différents substrats

Espèce	Substrat	Mole O ₂ /mole substrat		Observations
		mesuré	calculé pour oxydation totale	
<i>A. peroxydans</i>	D et L lactate	2,4	3	d'après De LEY
<i>A. aceti</i>	D lactate	2,5	3	d'après De LEY
	pyruvate	2	2,5	d'après De LEY
<i>A. rancens</i>	D lactate	2,5	3	d'après De LEY
	L lactate	2,2	3	d'après De LEY
	pyruvate	1,6 à 2,3	2,5	d'après De LEY
<i>A. rancens</i>	D lactate (pH 6)	2,22 à 2,37	3	d'après nos essais
	pyruvate (pH 3,8)	1,03	2,5	d'après nos essais
	pyruvate (pH 6)	2,46	2,5	d'après nos essais

Les essais que nous avons faits avec des éléments marqués ont permis de démontrer qu'à pH 6,0, *A. rancens* donne du CO₂ comme seul produit carboné du métabolisme du lactate. Une partie de la radioactivité, environ 20 p. 100, se retrouve assez fortement liée aux cellules pour ne pas pouvoir être entraînée par un lavage à l'eau. On peut supposer que cette fraction a été assimilée et soustraite à l'oxydation directe au moment où elle avait atteint le stade du pyruvate ou bien le stade acétate.

Oxydation du lactate suivant le pH

Nos expériences comme celles de De LEY et SCHELL (1959) ont montré que les isomères D et L de l'acide lactique étaient oxydés dans les mêmes conditions, quoique avec des vitesses différentes. Le premier produit intermédiaire est le pyruvate qui est formé par l'action des lactico-déshydrogénases D et L. Cet acide pyruvique subit un sort différent suivant le pH imposé aux bactéries.

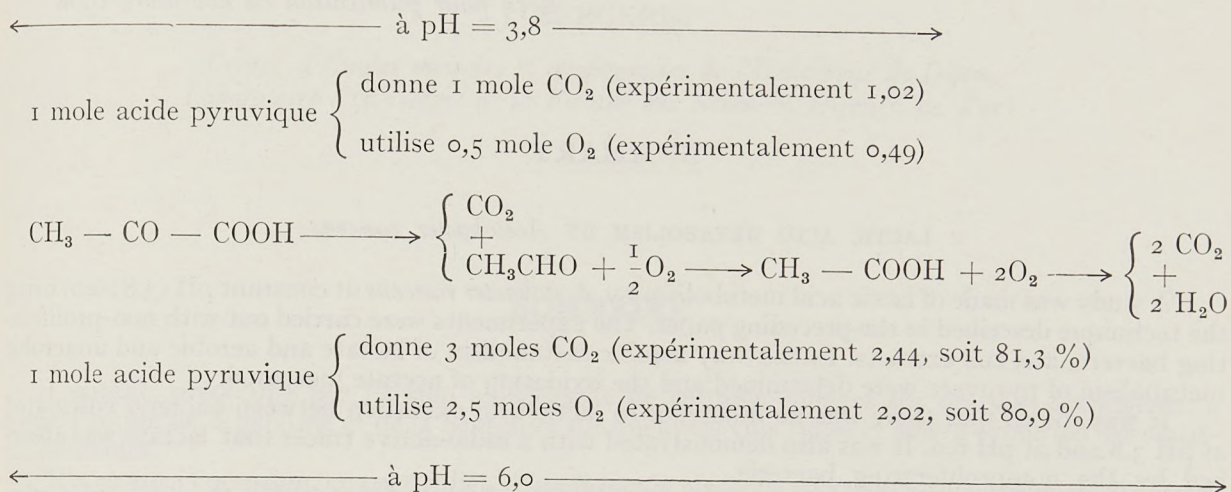
En milieu acide, pH 3,8, il est décarboxylé, grâce à une décarboxylase contenue dans le cytoplasme, avec production d'éthanal qui est ensuite oxydé jusqu'au stade acide acétique. Ce dernier s'accumule car les bactéries sont incapables d'oxyder l'acétate à ce pH. Nous avons trouvé, en effet, que l'oxydation de l'acétate ne se produit pas à pH 3,8. En effet, pour *A. rancens* cultivé à pH 3,8 nous avons trouvé que le pH optimum de cette réaction est 5 alors que NAKAYAMA (1959) a trouvé pour *A. suboxydans* cultivé dans des conditions différentes un optimum très étroit à pH 7.

A pH 6,0 l'oxydation du pyruvate suit la même voie, mais les bactéries se trouvent dans des conditions où elles peuvent oxyder l'acétate qui ne s'accumule plus dans le milieu. Le tableau 3 montre que 1 μ mole de pyruvate produit 2,44 μ moles de CO₂ alors que l'oxydation complète devrait en produire 3. La différence, 0,56 μ mole

soit 18,7 p. 100, doit correspondre à la partie que l'on a trouvé fixée sur les corps bactériens au cours de nos expériences avec le lactate radioactif et qui égale 20 p. 100.

On peut aussi déduire de ces expériences que l'assimilation se produit vraisemblablement par suite du métabolisme de l'acétate. En effet, à pH 3,8 pour une micromolécule de pyruvate on retrouve 1,02 micromolécule de CO_2 , ce qui à 2 p. 100 près correspond à la réaction théorique arrêtée au stade acétate. Au contraire à pH 6,0, où l'oxydation est complète, les cellules assimilent 18,7 p. 100 du carbone apporté par le substrat, ce qui représente 28 p. 100 de l'acétate formé à partir du pyruvate.

En résumé les résultats expérimentaux sont en accord avec la suite des réactions suivantes :



Le déficit de CO_2 constaté expérimentalement à pH 6,0 correspond à ce qui a été assimilé par les bactéries.

Cette voie d'oxydation du lactate n'est sûrement pas la seule. En effet, lorsque les bactéries oxydent du pyruvate les volumes de CO_2 dégagé correspondent aux valeurs théoriques, mais lorsque les mêmes bactéries oxydent du lactate la correspondance n'est plus aussi bonne. En particulier à pH 3,8 on constate que la quantité d'acide acétique accumulée ne correspond pas molécule pour molécule à celle du CO_2 dégagé.

On connaît d'autres systèmes pouvant intervenir dans le métabolisme de l'acidelactique. C'est ainsi que De LEY (1959) a trouvé que 16 p. 100 du pyruvate pouvaient être transformés en acétoïne par *A. rancens* et que ce microorganisme est capable d'oxyder entièrement l'acétoïne formée. Pour réaliser cette synthèse deux voies différentes sont d'ailleurs possibles, l'une passant par l'intermédiaire de l' α -acétolactate et l'autre faisant intervenir la condensation de deux molécules d'acétaldéhyde. RAO (1955) a aussi décrit chez *A. aceti* un système capable d'utiliser le pyruvate par phosphorylation oxydative.

La décarboxylation du pyruvate est fortement favorisée chez les bactéries cultivées à pH 3,8 et maintenues à ce pH. Dans la souche étudiée la décarboxylase se trouve entièrement dans la partie soluble de l'extrait alors que De LEY et SCHELL (1959) ont trouvé que cette activité enzymatique était présente dans les granules et dans la partie soluble d'*A. peroxydans*.

IV. — CONCLUSION

On voit donc qu'*Acetobacter rancens* peut donner, par oxydation du lactate, des produits différents : eau, gaz carbonique, acide acétique, éthanal, acétoïne, suivant les conditions dans lesquelles ont été cultivées les bactéries et l'oxygène dont elles peuvent disposer. Leur culture en milieu acide favorise la formation d'éthanal et ceci vient confirmer les observations faites dans le cidres contenant de l'acide lactique où le développement d'*Acetobacter* est toujours accompagné de production d'éthanal.

Reçu pour publication en novembre 1962

SUMMARY

LACTIC ACID METABOLISM BY *Acetobacter rancens*

A study was made of lactic acid metabolism by *Acetobacter rancens* at constant pH (3.8; 6.0) using the technique described in the preceding paper. The experiments were carried out with non-proliferating bacteria and cell extracts. In this way aerobic metabolism of lactate and aerobic and anaerobic metabolism of pyruvate were determined and the oxidation of acetate measured.

It was shown that there was no difference in lactic acid oxidation between bacteria cultivated at pH 3.8 and at pH 6.0. It was also demonstrated with a radio-active tracer that lactate was absorbed by the non-proliferating bacteria.

At pH 6.0 decarboxylation of pyruvate and oxidation of ethanol occurred at the same time, whereas at pH 3.8 decarboxylation of pyruvate preceded ethanol oxidation, and the latter was able to accumulate in the medium.

The bacteria cultivated at pH 3.8 showed a far greater aptitude for decarboxylizing pyruvate than those cultivated at pH 6.0; the optimum pH for the reaction corresponded with that of the culture.

In cell extracts the decarboxylase of the pyruvate was present in the soluble fraction and maximum activity took place in the extract coming from the bacteria cultivated at pH 3.8.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DUPUY P., MAUGENET J., 1962. Oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 219-225.
- DE LEY J., 1958. Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. I- General properties and taxonomic position of the species. *Ant. van Leeuwenhoek*, **24**, 281-287.
- DE LEY J., SCHELL J., 1958. Oxidation of several substrates by *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.*, **77**, 445-451.
- DE LEY J., 1959. On the formation of acetoin by *Acetobacter*. *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 352-365.
- DE LEY J., SCHELL J., 1959. Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. II- The enzymic mechanism of lactate metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, **35**, 154-165.
- MC ILVAINE T. C., 1921. *J. Biol. Chem.*, **49**, 183.
- MAUGENET J., 1962. Métabolisme de l'acide lactique par *Acetobacter* dans les cidres « framboisés ». *C. R. Acad. Agric.*, **4**, 214-217.
- OONO KOICHIRO, 1952. A colorimetric method for the determination of acetic acid in urine. *J. Biochem. (Japan)*, **39**, 133-135.
- RAO M. R. R., 1955. Pyruvate and acetate metabolism in *Acetobacter aceti* and *Acetobacter suboxydans*. *Ph. D. Thesis, Univ. of Illinois, Urbana*.
- TAKEYOSHI NAKAYAMA, 1959. Studies on acetic-acid bacteria. I. Biochemical studies on ethanol oxidation. *J. Biochem.*, **46** 1217-1225.

ACTION DE LA GÉLATINE ET DE LA BENTONITE SUR LA COULEUR ET L'ASTRINGENCE DE QUELQUES VINS

J. BERGERET

*Centre d'Etudes viticoles et œnologiques de l'Université de Dijon,
Laboratoire d'Œnologie de la Faculté des Sciences, Dijon (Côte d'or)*

SOMMAIRE

L'auteur, préoccupé par l'action améliorante de certains collages sur des vins astringents, a étudié l'action de la gélatine et de la bentonite sur quelques vins types et suivi l'évolution des matières tannoïdes.

Il a eu ainsi l'occasion, en particulier, d'appliquer la méthode spectrophotométrique de SUDRAUD pour l'appréciation de la couleur des vins rouges.

INTRODUCTION

L'expérience de tous les jours montre qu'une addition de gélatine à un vin rouge se solde par un entraînement non négligeable de substances tannoïdes. Certains millésimes de Bourgogne (1937 en particulier), connus pour leur très grande astringence avant la mise en bouteille, ont bénéficié de plusieurs traitements successifs à la gélatine sans lesquels leurs qualités n'auraient jamais pu s'extérioriser.

On explique assez bien le rôle que joue le tanin dans les phénomènes d'activation et de floculation de la gélatine. Mais si ce rôle capital est dû aux polyphénols du vin, on est en droit de penser que les matières colorantes participent aussi aux processus d'entraînement de la colle, puisqu'elles font partie des lies, et qu'en conséquence, la couleur du vin perdra de son intensité.

Dans son importante étude sur les matières tannoïdes, NÈGRE (1945) considère que l'œnotannin qui flocule la gélatine n'est pas une substance définie mais bien un ensemble de tannins et de matières colorantes. Nous avons voulu nous rendre compte s'il existe une proportionnalité entre la dose de gélatine employée et la diminution de la couleur, puis si celle-ci est uniformément répartie dans le spectre. Nous avons fait porter l'expérimentation sur des vins jeunes, rouges et rosés, dont une partie

des matières colorantes peut être considérée comme instable dans le temps et sur des vins rouges vieux en bouteilles ayant acquis et conservé une excellente limpidité depuis le dernier traitement stabilisateur.

L'idée directrice de ces recherches n'est pas nouvelle puisque FERRE (1958) a, depuis longtemps, consigné les observations suivantes : « On voit que la perte de couleur croît au fur et à mesure que la quantité de colle augmente, sans qu'il y ait cependant proportionnalité... » ; et plus loin : « Lorsque la matière colorante existe sous ces deux états (soluble et insoluble), c'est surtout la M. C. insoluble qui est enlevée par collage... ». Quelques chiffres concrétisent ces remarques, portant sur des vins de la récolte 1938 (dépourvus de M. C. insoluble) et des vins de la récolte 1937 (contenant une forte proportion de M. C. insoluble).

FERRE n'a pas précisé par quel moyen il a pu estimer les pertes respectives des deux « formes » précitées bien qu'il ait décrit un appareil et une technique de prévision des dépôts sous le nom de « déposimètre ». Bon nombre d'auteurs s'accordent pour reconnaître la non-proportionnalité entre le poids de gélatine ou de protéine mis en œuvre et celui du tanin entraîné (consulter notamment RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1961 a). Mais dans ces relations, il est peu ou pas question du devenir de la matière colorante. C'est la raison pour laquelle nous sommes surtout attaché à l'étude de l'influence du collage à la gélatine sur la couleur des vins ainsi qu'à celle du traitement à la bentonite de ces mêmes vins, séparément et en association.

La bentonite appauvrit-elle les vins en couleur ? Certainement puisque les lies de colle sont colorées ; les résultats sont surtout spectaculaires avec les vins rosés pâles obtenus par vinification en blanc des raisins rouges. La littérature fournit peu d'exemples ; RIBEREAU-GAYON et PENBAUD (1961 b) ont chiffré l'importance des troubles dus à la précipitation du colorant colloïdal avant et après traitement à la bentonite. Ces auteurs constatent le phénomène d'entraînement sans l'expliquer complètement. Il est intéressant d'essayer de chiffrer la part qui revient au tanin et aux matières colorantes lors de la floculation de la bentonite seule et de se rendre compte si la floculation mutuelle (bentonite-gélatine) entraîne plus ou moins de couleur que l'une et l'autre prises isolément.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL, ET MÉTHODE D'APPRÉCIATION

Trois types de vin ont été soumis au collage à la gélatine, à la bentonite et à l'association des deux :

1^o Un rouge d'Algérie récolté en 1955, résultant d'un mélange à la cuve de *Grenache*, *Cinsault* et *Carignan*, qui fut filtré à la mise en bouteilles en 1957 et qui ne présentait aucun dépôt de colorant lors de la mise en route de l'expérience en janvier 1962.

2^o Un rouge de *Pinot noir* de Bourgogne de l'année 1961, directement tiré du fût sans avoir été soutiré, collé ni filtré.

3^o Un vin rosé de *Pinot noir* non macéré de la même récolte n'ayant subi aucun traitement stabilisateur.

Nous avons utilisé une gélatine en morceaux très peu colorée, mise en suspension dans l'eau à la concentration de 10 g/litre et une bentonite « française » contenant moins de 1 p. 100 d'éléments lourds se sédimentant après 48 heures de repos au sein d'une suspension à 20 g/litre de produit brut agitée pendant 12 heures.

Lorsque les deux colles sont associées, l'addition de la gélatine succède à celle de la bentonite après 1 heure de repos et remise en suspension du floculat. Pour chaque type de vin, l'application des doses de colle s'est faite de la manière suivante :

Doses en g/hectolitre de produit sec

Colle ↓	N° →	1	2	3	4	5	6
Gélatine (G)		5	10	15	20	25	30
Bentonite (B)		20	40	60	80	100	120
Bentonite + Gélatine (B + G) .		20 + 5	40 + 10	60 + 15	80 + 20	100 + 25	120 + 30

Les résultats seront toujours exprimés compte tenu de la dilution résultant du mélange de la suspension des colles au vin.

Après 48 heures, les échantillons traités sont centrifugés puis analysés. L'influence sur la couleur est concrétisée par des courbes d'absorption entre 400 et 600 m/ μ . La somme des densités optiques à 420 et 520 m/ μ exprime l'intensité colorante et le rapport : d. o. 420/520 correspond à la nuance. Se faisant, nous avons adopté la méthode d'expression proposée et appliquée par SUDRAUD (1958) qui nous a aussi servi dans l'étude des conditions d'une maturation accélérée d'un vin de Bourgogne (BERGERET, 1959). A titre indicatif, le spectrophotomètre utilisé est un modèle JEAN et CONSTANT (Prolabo). Les vins rouges sont dilués au demi et examinés sous une épaisseur de 2 mm ; le vin rosé est utilisé sans dilution sous une épaisseur de 1 cm.

L'astringence est chiffrée arbitrairement en indice de permanganate par oxydation manganique à froid en présence de carmin d'indigo selon la méthode donnée par RIBEREAU-GAYON et MAURIE (1942).

INFLUENCE DE LA GÉLATINE ET DE LA BENTONITE SEULES ET ASSOCIÉES

A — Vins vieux d'Algérie

Dans le tableau 1, nous avons rassemblé les valeurs des densités optiques observées puis calculées en fonction des différents taux de dilution pour chaque cas particulier. Afin de ne pas surcharger le tableau, il nous a paru inopportun de reproduire toutes les densités optiques de 400 à 600 m μ , de 20 en 20, sauf celles des témoins et des échantillons G₍₆₎, B₍₆₎ et (B + G)₆. Y figurent, par contre, toutes les d. o. à 420 et 520 m μ de tous les autres lots afin de calculer leur somme et leur rapport. Le graphique 1 reproduit les courbes d'absorption du vin témoin et des trois échantillons collés avec les doses les plus élevées ; le graphique 2 représente les pourcentages de perte de l'intensité colorante (S), pour tous les cas envisagés.

Une première remarque s'impose : la « nuance » de ces vins vieux correctement stabilisés avant la mise en bouteille n'est pratiquement pas affectée par l'action de la gélatine, de la bentonite et par l'association des deux (T variant de 0,84 à 0,88).

Aux doses moyennes d'emploi de la gélatine (15 à 20 g/hl) l'influence de la colle sur l'intensité colorante est plus accentuée que celle de la bentonite ; elle ne fait que croître rapidement avec la concentration. Enfin, l'association des deux provoque toujours des pertes beaucoup plus élevées sauf pour ce qui est de la dernière dose expérimentée (120 g + 30 g/hl), rarement atteinte dans la pratique courante, à partir de laquelle le phénomène semble s'inverser au profit de la gélatine.

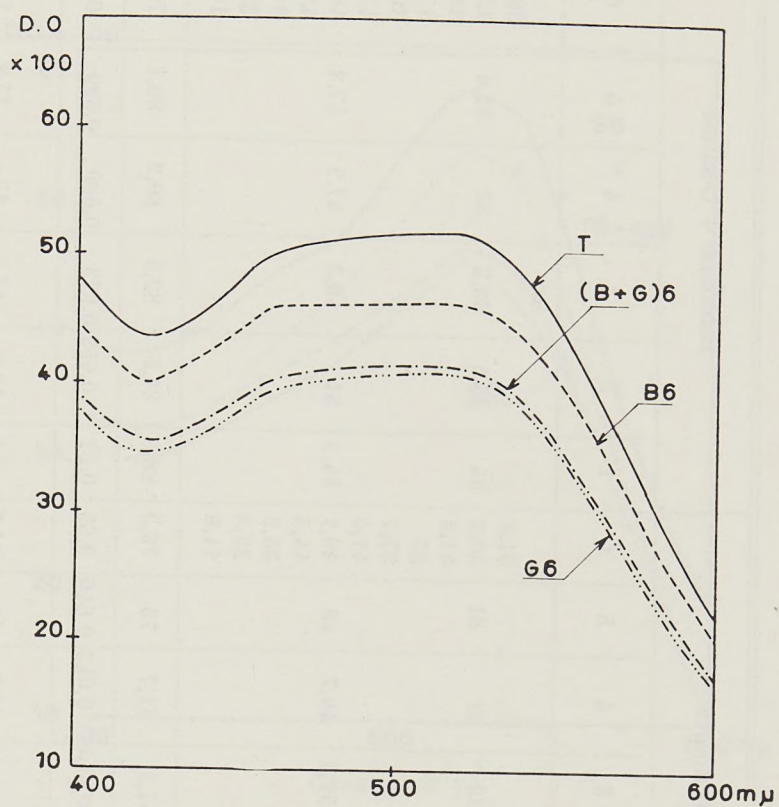
B — Vins rouges de Pinot (1961)

On trouvera dans le tableau 2 les valeurs des densités optiques ; dans le graphique 3, la représentation des courbes d'absorption ; dans le graphique 4, celle des pertes. Comme précédemment, il convient de faire état de l'influence des colles sur

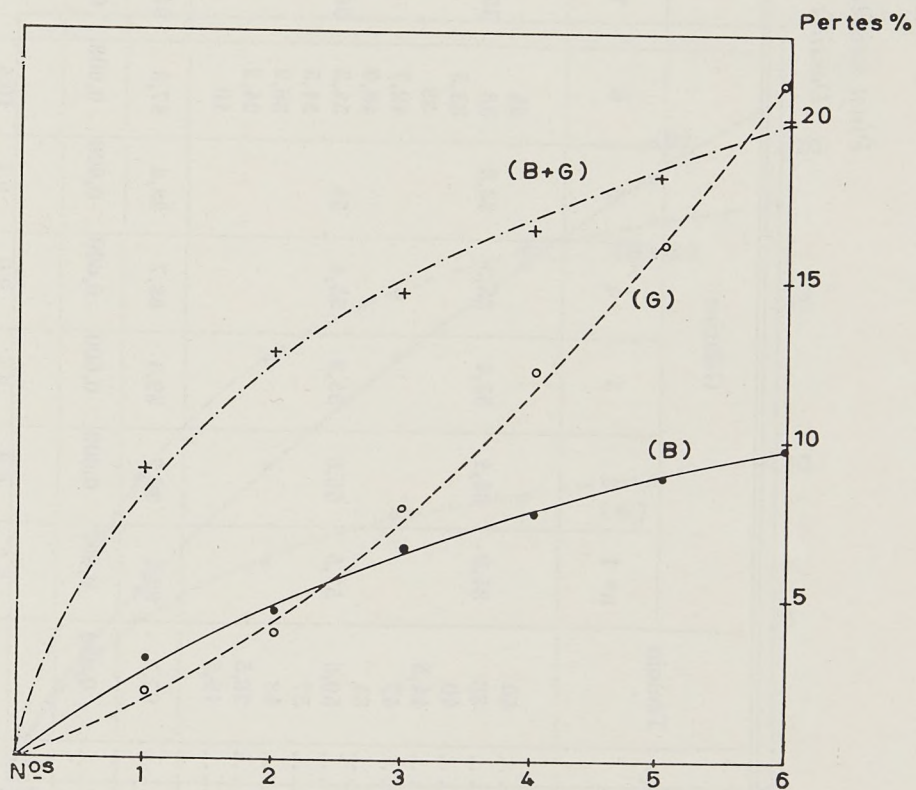
TABEAU I
Vins d'Algérie 1955
Densités optiques $\times 100$

L. O. m μ	Témoïn	Gélatine						Bentonite						Bentonite + Gélatine					
		n° 1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
400	48						38,1						44,5						39
420	43,5	43,2	42,7	40,8	38,8	36,9	34,5	42,5	42,3	44,3	40,8	40,4	40	40,6	39	38,4	37,4	36,5	35,4
440	45,5						36						42,4						37
460	50,5						39,5						46,1						40,3
480	51						40,2						46,1						40,9
500	51,5						40,7	49,9	48,9	47,9	47,3	46,7	46,1	46	44,4	43,3	42,4	41,6	40,8
520	52	50,3	49	47	45	43	40,7						46,3						38,2
540	48,5						37,6						43,5						32,2
560	41						34,4						37,2						24,5
580	31						23,7						27,8						17,4
600	22						17						20,7						
S.....	95,5	93,5	91,7	87,8	83,8	79,9	75,2	92,4	91,2	89,1	88,1	87,1	86,3	86,6	83,1	81,6	79,8	78,1	76,2
T	0,84	0,86	0,87	0,87	0,86	0,86	0,85	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,88	0,88	0,88	0,88	0,87	
Perte % sur S...		2,1	3,9	8	12,2	16,3	21,2	3,25	4,5	6,7	7,75	8,8		9,32	12,9	14,5	16,4	18,2	20,2

S : d. o. 420 + 520 m μ T :
d. o. 420



GRAPHIQUE 1



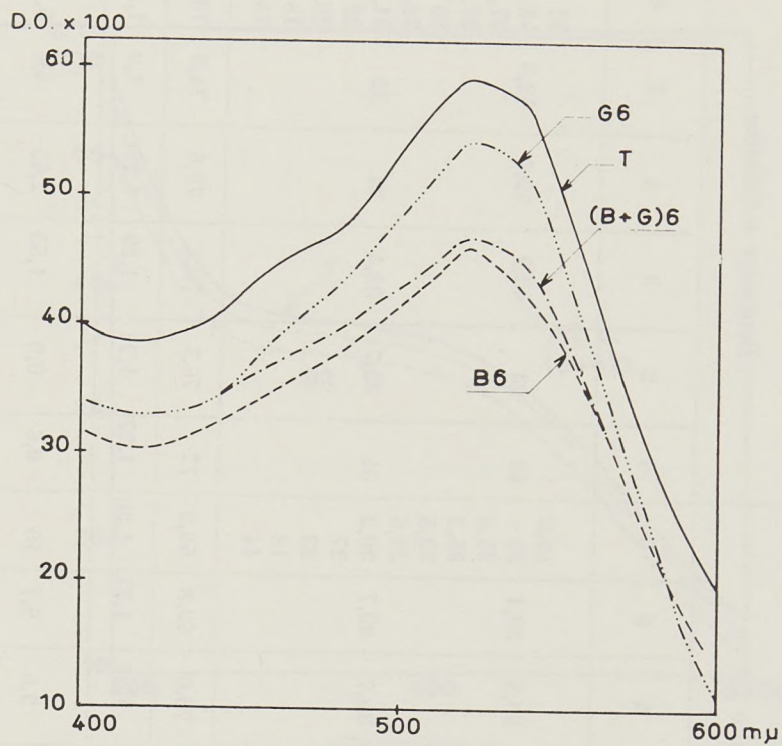
GRAPHIQUE 2

TABEAU 2

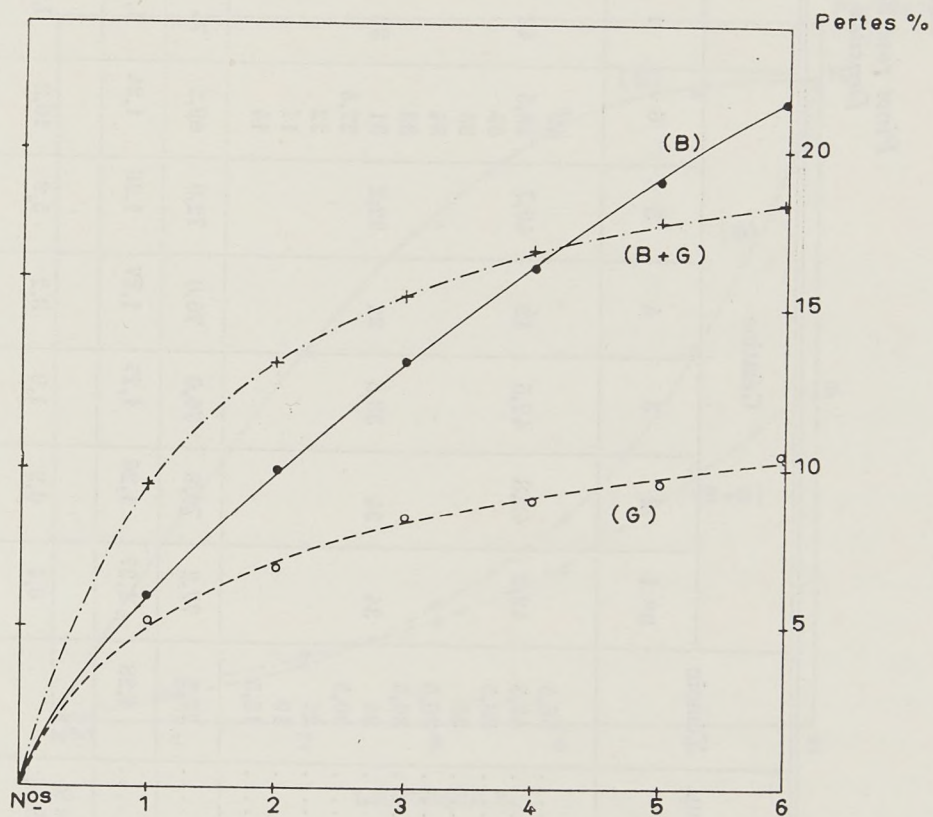
Pinot noirien de Bourgogne 1961.
Densités optiques $\times 100$

L. O. m μ	Témoïn	Gélatine						Bentonite						Bentonite + Gélatine					
		n° 1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
400	40	34,9	34,1	33,4	33,3	33,3	34	35,8	34,2	33	32	31	31,8	34	33,5	33,2	33	32,8	33,8
420	38						33						30,2						32,7
440	40						33,5						31,8						33,8
460	44,5						39						35						37
480	47						42,7						37,7						39,2
500	54						48,9	56	53,5	51,5	49,7	48	46,1	54,3	51	49,3	47,9	47,3	46,9
520	59,5	57,5	56,6	55,9	55,4	55	54,3						44,5						45,2
540	57						51,5						33,8						34,3
560	43						38,9						22,3						23,4
580	28,5						24,2						14,9						16,9
600	19,5						10												
S.....	97,5	92,4	90,7	89,3	88,7	88,3	87,3	91,8	87,7	84,5	81,7	79	76,3	88,3	84,5	82,5	80,9	80,1	79,6
T	0,639	0,607	0,602	0,600	0,600	0,600	0,608	0,640	0,640	0,640	0,640	0,643	0,640	0,62	0,657	0,673	0,680	0,690	
Perte % sur S ...		5,2	6,9	8,4	9,0	9,4	10,4	5,8	10	13,4	16,2	19	21,7	9,4	13,3	15,4	17	17,8	18,3

S : d. o. 420 + 520 m μ T = d. o. $\frac{420}{520}$



GRAPHIQUE 3



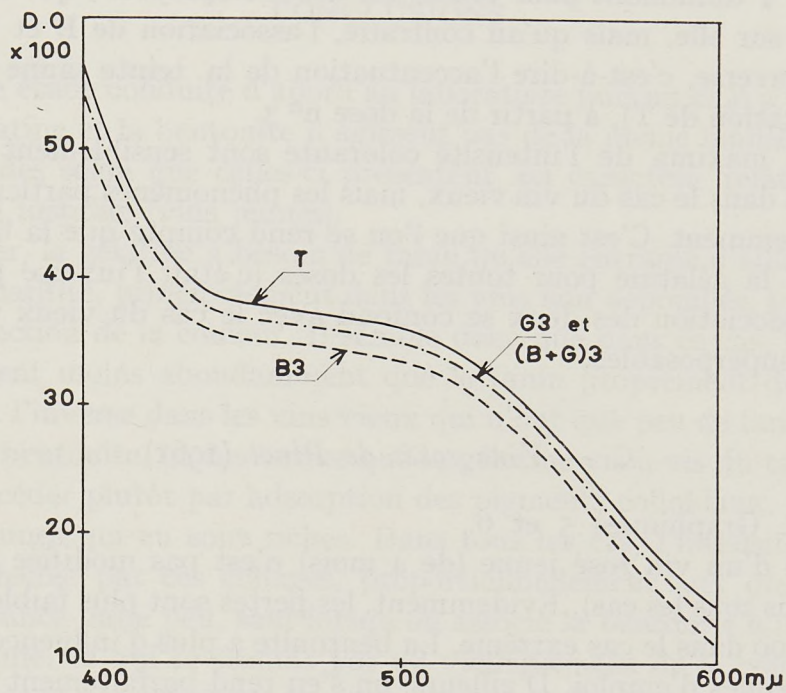
GRAPHIQUE 4

TABLEAU 3

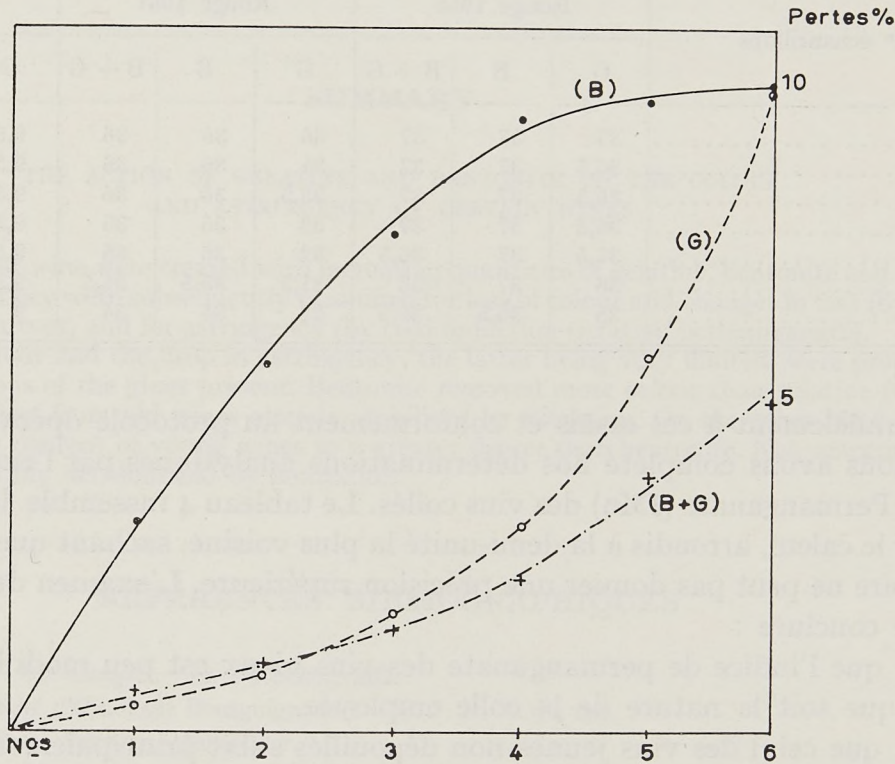
Pinol rosé de Bourgogne 1961.
Densités optiques $\times 100$

L. O. m μ	Témoïn	Gélatine						Bentonite						Bentonite + Gélatine					
		n° 1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
400	56,5						49						49,5						51
420	43,5	43,2	42,8	42,5	42	40,7	38,5	42	44	40	39,3	39,1	39	43	43	42,9	42,6	42,3	42
440	38,5						35						35,5						37,5
460	38						35						35,2						37,2
480	36,5						34						33,5						35
500	36,5						33						34,5						32,2
520	34	34	34	33,5	33	32,2	31	33	32	31,5	30,7	30,7	30,2	34	33,7	33,4	33	32	34,5
540	30,5						27,5						27						29
560	25						22						23						23,75
580	19						17						18						18
600	15,5						14						14						15
S.....	77,5	77,2	76,8	76,0	75,0	72,9	69,5	75	73	71,5	70,0	69,8	69,2	77	76,7	76,3	75,6	74,3	73,5
T	1,28	1,27	1,26	1,27	1,27	1,26	1,24	1,27	1,28	1,27	1,27	1,27	1,28	1,27	1,28	1,29	1,29	1,3	1,33
Perte % sur S....		0,4	0,9	1,9	3,2	5,9	10,3	3,2	5,8	7,7	9,6	9,7	10	0,6	0,9	1,55	2,45	4,1	5,1

S : d. o. 420 + 520 m μ T : d. o. $\frac{420}{520}$



GRAPHIQUE 5



GRAPHIQUE 6

la nuance des vins traités et remarquer que la gélatine a tendance à « raffermir » la teinte rouge, T diminuant pour toutes les doses employées ; que la bentonite n'a pas d'influence sur elle, mais qu'au contraire, l'association de B et de G provoque le phénomène inverse, c'est-à-dire l'accentuation de la teinte jaune aux dépens du rouge (augmentation de T), à partir de la dose n° 3.

Les pertes maxima de l'intensité colorante sont sensiblement équivalentes à celles observées dans le cas du vin vieux, mais les phénomènes particuliers se présentent tout différemment. C'est ainsi que l'on se rend compte que la bentonite a plus d'influence que la gélatine pour toutes les doses (c'était l'inverse précédemment). Par contre, l'association des deux se confond avec le cas du vieux vin, les courbes étant presque superposables.

C — Vins rosés de Pinot (1961)

Tableau 3. Graphiques 5 et 6.

La nuance d'un vin rosé jeune (de 4 mois) n'est pas modifiée par un collage (T constant dans tous les cas). Évidemment, les pertes sont plus faibles, ne dépassant que peu 10 p. 100 dans le cas extrême. La bentonite a plus d'influence que la gélatine aux doses moyennes d'emploi. D'ailleurs, on s'en rend parfaitement compte à l'examen des lies, tandis que l'association des deux a pour conséquence de protéger la couleur.

TABLEAU 4

Indices de Permanganate (IMn)

N° échantillons	Rouge 1955			Rouge 1961			Rosé 1961		
	G	B	B + G	G	B	B + G	G	B	B + G
Témoin	37	37	37	36	36	36	9,5	9,5	9,5
1	36,5	37	37	34	36	36	9,5	9,5	9,5
2	36,5	37	37	33,5	36	36	9,5	9,5	9,5
3	36,5	37	37	33	36	35	9,5	9,5	9,5
4	36,5	37	36,5	32	36	35	9,5	9,5	9,5
5	36	37	36	31,5	35,5	34,5	9,5	9	9
6	35	36,5	35,5	31	34	34	9	8,5	9

Parallèlement à ces essais et conformément au protocole opératoire défini plus haut, nous avons complété nos déterminations analytiques par l'expression de l'Indice de Permanganate (IMn) des vins collés. Le tableau 4 rassemble les chiffres obtenus par le calcul, arrondis à la demi-unité la plus voisine, sachant que cette technique opératoire ne peut pas donner une précision supérieure. L'examen de ce tableau permet de conclure :

— que l'indice de permanganate des vins vieux est peu modifié par le collage, quelle que soit la nature de la colle employée.

— que celui des vins jeunes non dépouillés subit principalement l'influence des doses croissantes de gélatine (à l'inverse de la couleur, se reporter au § B).

— que le pouvoir réducteur d'un vin rosé vis-à-vis du permanganate à froid est indifférent aux doses et à la nature des colles.

CONCLUSIONS

La présente étude conduite d'abord au laboratoire puis au chai a permis de constater que la gélatine et la bentonite n'agissent pas de la même manière vis-à-vis des matières tannoïdes selon que celles-ci présentent un caractère relativement stable (vins vieux), ou instable (vins jeunes).

Pour flocculer, la gélatine a besoin de tanin qu'elle entraîne d'ailleurs en plus ou moins grande quantité, principalement dans les vins non dépouillés, tout en assurant une bonne protection de la couleur. Il semble donc que dans ce cas, les polyphénols colorés participent moins abondamment que le tanin proprement dit au processus du collage. C'est l'inverse dans les vins vieux qui n'ont que peu de tanin précipitable.

Quant à la bentonite, moins active que la gélatine vis-à-vis du tanin, sa floculation semble procéder plutôt par adsorption des pigments colloïdaux, principalement dans les vins jeunes qui en sont riches. Dans tous les cas, l'intensité colorante est sensiblement affectée par ces collages, proportionnellement aux doses appliquées, tandis que la nuance varie peu, sauf lorsqu'on associe la bentonite à la gélatine pour coller un vin jeune, ce qui se traduit par un vieillissement de la couleur.

Si nous n'avons pas constaté de chute spectaculaire de l'astringence dans tous les cas considérés, il s'agissait en fait de vins peu taniques à l'origine. Mais il nous paraît opportun de mettre en relief les conséquences des collages sur l'appauvrissement de la « robe » des vins et sur la décoloration sensible que subissent les rosés non macérés lorsqu'ils sont traités à la bentonite.

Reçu pour publication en septembre 1962.

SUMMARY

THE ACTION OF GELATINE AND BENTONITE ON THE COLOUR
AND ASTRINGENCY OF CERTAIN WINES

Several types of wine were treated with increasing quantities of gelatine, bentonite and mixtures of both materials. They were subsequently examined for loss of colour and changes in tint (by a study of the absorption curves) and for astringency (by cold reduction titration permanganate).

The loss of colour and the drop in astringency, the latter being very limited, were proportional to the concentrations of the glues present. Bentonite removed more colour than gelatine from very yellow wines, but less from old wines already stabilized by filtration. On the other hand, gelatine reduced the tannin content of young wines to a greater degree than bentonite. Non-macerated rosés wines were perceptibly decolourized by bentonite.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERGERET J., 1959. 84^e Congrès. Soc. Savantes., 253.
 FERRE L., 1958. Traité d'Œnologie Bourguignonne. Ed. I. N. A. O., 195.
 NEGRE E., 1945. Thèse Sciences, Montpellier.
 RIBERAU-GAYON J., MAURIE A., 1942. Bull. Off. Int. Vin., n°150, 60.
 RIBERAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1961 a. Traité d'Œnologie, II, 685.
 RIBERAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1961 b. Traité d'Œnologie, II, 827.
 SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. Ann. Technol. Agric., n° 2, 203.

DÉCOLORATION DES VINS ROUGES PAR CERTAINS SELS DE MÉTAUX LOURDS

H. BIOL et Ch. FOULONNEAU

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune (Côte-d'Or)

SOMMAIRE

La détermination du rapport $T/P = \text{œnotanins} / \text{Polyphénols non tanins}$, préconisé par le professeur NÈGRE pour différencier certains types de vins, et proposé par d'autres auteurs pour définir ou classer les vins blancs, rosés et rouges, nécessite une précipitation totale ou partielle des polyphénols.

Les auteurs du présent travail étudient comparativement et qualitativement la décoloration des vins rouges traités au moyen de sels de métaux lourds (zinc, mercure, plomb).

Ils utilisent également les mêmes techniques avec un extrait de pivoine.

I. — INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont étudié la défécation des vins par divers métaux. Presque tous ont remarqué des différences dans la qualité des défécations suivant le métal à l'égard de l'intensité ou de la nature de la matière colorante (L. SEMICHON et M. FLANZY, 1926).

Les travaux de E. NÈGRE (1939, 1942, 1945) avaient signalé la résistance au zinc de certains cépages hybrides.

Les buts recherchés par ces auteurs étaient :

— d'une part la clarification d'un vin en vue de certains dosages (sucres, déviation saccharimétrique...)

— d'autre part, la précipitation totale ou différentielle des polyphénols en vue de déterminer leur valeur totale ou partielle.

Au cours de l'année 1962, divers spécialistes ont été amenés à rechercher une définition des vins blancs, rosés et rouges. Cette définition devait être assortie de

certaines normes analytiques permettant de reconnaître le type de vinification (avec ou sans macération) du vin.

C'est pourquoi le rapport T/P établi par le professeur E. NÈGRE fut à nouveau proposé. Mais il convenait de connaître quelles valeurs peut prendre ce rapport suivant le type de vin.

Les auteurs de la présente note ont essayé de déterminer certaines de ces valeurs. Ils ont alors constaté la « résistance » très particulière de certains types de vins à la défécation par certains métaux et selon certaines techniques.

Des études anciennes critiquaient l'emploi de tel ou tel métal quant à la qualité de la défécation. De telle sorte qu'il était parfois nécessaire de recourir à une pincée de noir animal pour parfaire la décoloration.

Se basant sur ces remarques anciennes, et sur leurs constatations personnelles, les auteurs ont entrepris de vérifier l'influence des trois métaux : mercure, plomb et zinc sur la précipitation des matières colorantes de vins de types différents.

Ils ont utilisé la chromatographie sur papier pour essayer de préciser le type de matières colorantes « résistantes ». C'est un travail qualitatif. Mais aussi, ils ont essayé d'indiquer quelle quantité de réactif (contenant le métal), il fallait employer pour obtenir une précipitation totale (quand cela est possible) des anthocyanes. Le même travail a été appliqué sur un extrait de pivoine rouge.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — MÉTHODES DE DÉFÉCATION

Le nombre de méthodes utilisées sera très restreint.

D'une part les deux méthodes provisoires recommandées par la Sous-Commission des méthodes d'analyses de l'Office International du Vin.

L'une utilise un sel de mercure, l'autre un sel de plomb.

D'autre part, les méthodes de E. NÈGRE (E. NÈGRE, 1945) au plomb et au zinc, destinées au dosage différentiel des polyphénols.

1^o) *Défécation par le mercure*

La précipitation au sulfate de mercure (L. SEMICHON et M. FLANZY, 1926), modifiée (PLUCHON, 1937) est employée à la dose forte préconisée par ces auteurs lorsqu'on a des vins à « coloration résistante ». La dose du réactif mercurique est alors de 6 ml pour 100 ml de vins mis en œuvre.

2^o) *Défécation par le plomb*

a) *Technique préconisée par l'Office International du Vin.*

La méthode prévoit l'emploi de l'acétate neutre de plomb sur le vin neutralisé et désalcoolisé, l'excès de plomb étant éliminé par l'oxalate de sodium.

Cette méthode est utilisée dans le but de doser les sucres.

b) *Technique de E. NÈGRE.*

La précipitation par le plomb en milieu fortement alcalin, utilisée par le professeur NÈGRE, a pour but de précipiter les polyphénols. Elle fait abstraction des perturbations qu'elle peut provoquer vis-à-vis des sucres. C'est elle qui est utilisée pour établir le rapport T/P.

3°) *Défécation par le zinc*

C'est l'acétate de zinc ammoniacal employé par E. NÈGRE (E. NÈGRE, 1945) pour réaliser une précipitation différentielle des polyphénols, qui sera utilisé.

B. — MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE

La méthode internationale provisoire, décrite dans la Convention Internationale d'Unification des méthodes d'analyses sera utilisée. On la trouvera décrite sous la référence : JAULMES-NEY, 1960.

La chromatographie sera faite :

— d'une part sur les liquides surnageant les défécats, liquides préalablement acidifiés par l'acide chlorhydrique pour les amener à un pH voisin de 3.

— d'autre part, dans le cas de cépages contenant de la malvine (diglucoside du malvidol), sur une fraction des défécats solubilisés plus ou moins complètement par l'acide chlorhydrique.

C. — TYPES DE VINS ESSAYÉS

Des premiers essais effectués, des différences dans la qualité des défécations sont apparues entre les vins contenant de la malvine, les vins teinturiers, et les vins provenant de cépages rouges à jus blanc. C'est un choix de vins de types variés qui a été utilisé.

Vins de <i>V. Vinifera</i>	à jus blanc	<i>Pinot noir fin de Bourgogne</i> <i>Aramon noir</i>
	teinturiers	<i>Alicante H. Bouschet</i> <i>Gamay Fréaux</i>
Vins d'hybrides	sans malvine	<i>Seibel 54-55</i> <i>Landot 244</i>
	avec malvine	<i>Oberlin 595</i> <i>Seyve Villard 18315.</i>

Enfin un extrait de pivoine a été expérimenté.

III. — RÉSULTATS

A. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES SUR VINS

Ces essais ont porté sur les vins précités, en leur appliquant exactement les techniques opératoires de défécation par le mercure, le plomb, le zinc. La constatation des résultats porte :

— sur l'examen visuel des liquides surnageant les défécats. Les liquides étant légèrement acidifiés par l'acide chlorhydrique. La teinte du liquide indique s'il y a encore en suspension une fraction d'anthocyanes.

— sur l'examen chromatographique de ces liquides, lorsqu'il se révèle que le liquide contient des matières colorantes rouges.

— éventuellement sur les défécats solubilisés par l'acide chlorhydrique et examinés en chromatographie.

1°) *Défécation par le mercure*a) *Appréciation visuelle des liquides surnageants acidifiés.*

Vins examinés	Couleur des liquides
<i>Pinot noir fin de Bourgogne</i>	± jaune ou incolore
<i>Aramon noir</i>	± jaune ou incolore
<i>Alicante H. Bouschet</i>	± jaune ou incolore
<i>Gamay Fréaux</i>	± jaune ou incolore
<i>S. 54-55</i>	± jaune ou incolore
<i>L. 244</i>	± jaune ou incolore
<i>Oberlin 595</i>	très légèrement rose
<i>S. V. 18315</i>	très légèrement rose

b) *Appréciation chromatographique des liquides surnageants acidifiés.*

Vins examinés	Appréciation chromatographique en lumière UV
<i>Oberlin 595</i>	très légère réaction de malvine
<i>S. V. 18315</i>	absence de malvine

Dans le cas présent, il n'est pas nécessaire de faire un examen des défécats.

2°) *Défécation par le plomb*a) *Technique préconisée par l'Office International du Vin.* α — *Appréciation visuelle des liquides surnageants acidifiés.*

Vins examinés	Couleur des liquides
<i>Pinot noir fin de Bourgogne</i> ..	rose très léger
<i>Aramon noir</i>	rose très léger
<i>Alicante H. Bouschet</i>	rouge
<i>Gamay Fréaux</i>	rouge
<i>S. 54-55</i>	pelure d'oignon très léger
<i>L. 244</i>	pelure d'oignon très léger
<i>Oberlin 595</i>	rouge franc
<i>S. V. 18315</i>	rouge violacé

Tous les liquides, étant plus ou moins rouges, seront examinés en chromatographie.

 β — *Appréciation chromatographique des liquides surnageants acidifiés.*

Vins examinés	Examen en lumière du jour	Examen en lumière UV
<i>Pinot noir fin de Bourgogne</i>	aucune tache apparente	pas de tache caractéristique
<i>Aramon noir</i>	aucune tache apparente	pas de tache caractéristique
<i>Alicante H. Bouschet</i>	tache au niveau monoglucoside avec traînée	pas de tache caractéristique
<i>Gamay Fréaux</i>	tache au niveau monoglucoside avec traînée	pas de tache caractéristique
<i>S. 54-55</i>	pas de tache appréciable	pas de tache caractéristique
<i>L. 244</i>	pas de tache appréciable	pas de tache caractéristique
<i>Orbelin 595</i>	tache intense au niveau des diglucosides	intense réaction de malvine
<i>S. V. 18315</i>	tache intense au niveau des diglucosides	intense réaction de malvine

Il n'y a pas intérêt à examiner les défécats.

b) *Technique de E. NÈGRE.*

La technique est employée conformément à la description faite par l'auteur et en milieu nettement alcalin, à pH supérieur à 10. La dose de réactif employée est de 5 ml d'acétate de plomb pour une prise d'essai de 25 ml de vin.

Les résultats sont exactement comparables à ceux obtenus par la défécation mercurique.

3°) *Défécation par le zinc*

a) *Appréciation visuelle des liquides surnageants acidifiés.*

Vins examinés	Couleur des liquides
<i>Pinot noir fin de Bourgogne</i>	pelure d'oignon léger
<i>Aramon noir</i>	jaune
<i>Alicante H. Bouschet</i>	rouge
<i>Gamay Fréaux</i>	rouge
<i>S. 54-55</i>	pelure d'oignon léger
<i>L. 244</i>	pelure d'oignon léger
<i>Oberlin 595</i>	rouge foncé
<i>S. V. 18315</i>	rouge foncé

b) *Appréciation chromatographique des liquides surnageants acidifiés.*

Vins examinés	Examen en lumière du jour	Examen en lumière UV
<i>Pinot noir fin de Bourgogne</i>	légère traînée au niveau des monoglucosides	très légère tache au niveau des monoglucosides
<i>Aramon noir</i>	légère traînée au niveau des monoglucosides	très légère tache au niveau des monoglucosides
<i>Alicante Bouschet</i>	belle tache au niveau des monoglucosides	tache appréciable au niveau des monoglucosides
<i>Gamay Fréaux</i>	belle tache au niveau des monoglucosides	suivie d'une traînée tache appréciable au niveau des monoglucosides
<i>S. 54-55</i>	légère tache au niveau des monoglucosides	très légère tache au niveau des monoglucosides
<i>L. 244</i>	légère tache au niveau des monoglucosides	très légère tache au niveau des monoglucosides
<i>Oberlin 595</i>		
<i>S. V. 18315</i>		

Les défécats de l'*Oberlin 595* et du *S. V. 18315* sont examinés en chromatographie. L'*Oberlin 595* présente une fluorescence de malvine, qualifiée de « traces ». Aucune fluorescence n'est observée avec le *S. V. 18315*.

B. — ESSAIS COMPLÉMENTAIRES SUR VINS

Le mercure et le plomb selon la méthode E. NÈGRE, ayant donné des résultats suffisants bien qu'à la limite des possibilités des méthodes, des essais complémentaires seront réalisés.

Ces essais portent sur l'examen des deux techniques :

- défécation par le plomb préconisée par l'Office International du Vin,
- défécation par le zinc, selon la technique E. NÈGRE.

Ces essais ont pour but de déterminer quelles doses des réactifs sont nécessaires

pour précipiter la totalité des matières colorantes. A cet effet, la quantité de réactif employé restant constante, le volume de vin mis en œuvre a été les 4/5, 3/5, 2/5, 1/5 de celui fixé par les méthodes. Le volume de vin essayé a été reconstitué soit par un complément d'eau distillée, soit par un tampon tartrique pH 3,0. Les résultats sont pratiquement les mêmes.

Il a été vu précédemment que les cépages particulièrement « résistants » à ces métaux sont les teinturiers et les hybrides à malvine. En conséquence les essais seront effectués sur les deux cépages suivants :

- *Alicante H. Bouschet* ;
- *Oberlin 595*.

Il a été constaté que le plomb, technique de l'O. I. V., et le zinc ont des difficultés à entraîner la malvine. Pour vérifier l'entraînement de cette substance, les défécats de l'Oberlin 595 seront examinés.

1^o) Défécation par le plomb (méthode internationale)

a) Appréciation visuelle des liquides surnageants acidifiés.

Rapports de dilution	Couleur des liquides Alicante	Couleur des liquides Oberlin
—	—	—
4/5	Rouge	Rouge
3/5	Rouge	Rouge
2/5	Rose clair	Rose clair
1/5	Incolore	Pratiquement incolore

b) Appréciation chromatographique des liquides surnageants acidifiés.

Compte tenu des dilutions, les dépôts des solutés ont été équilibrés pour être comparables.

	Examen en lumière du jour	Examen en lumière UV
—	—	—
<i>Alicante H. Bouschet</i>		
Dilution aux 4/5.....	Légère tache au niveau monoglucoside	
Dilution au 1/5.....	Aucune trace	
<i>Oberlin 595</i>		
Dilution aux 4/5.....	Tache importante au niveau diglucoside	Fluorescence intense de malvine
Dilution au 1/5.....	Tache très faible	Fluorescence très légère de malvine

L'influence de la quantité de plomb est nette tant sur l'Oberlin que sur l'Alicante ; mais alors que l'Alicante est totalement déféqué par dilution au 1/5, l'Oberlin « résiste » encore un peu. Le plomb ayant entraîné quantitativement les matières colorantes, il n'est pas utile de vérifier l'état des défécats.

2^o) Défécation par le zinc

a) Appréciation visuelle des liquides surnageants acidifiés.

Rapports de dilution	Couleur des liquides Alicante	Couleur des liquides Oberlin
—	—	—
4/5	Rouge	Rouge intense
3/5	Rouge	Rouge intense
2/5	Rouge	Rouge intense
1/5	Rouge clair	Rouge moyen

b) *Appréciation chromatographique des liquides surnageants acidifiés.*

Les dépôts de solutés ont été équilibrés en fonction des dilutions.

Examen en lumière du jour

Examen en lumière UV

Alicante H. Bouschet

Dilution aux 4/5.

Dilution au 1/5.

Oberlin 595

Dilution aux 4/5.

Dilution au 1/5.

Trainée rose

Trainée rose

Tache importante au niveau de la malvine

Tache importante au niveau de la malvine

Trainée violacée

Trainée violacée

Fluorescence intense de malvine

Fluorescence intense de malvine

On peut noter qu'il y a équivalence dans les intensités de coloration tant avec l'Oberlin qu'avec l'*Alicante H. Bouschet*.

c) *Examen des défécats de l'Oberlin 595.*

Cet examen a pour but de vérifier si la malvine est entraînée par le zinc. L'examen des chromatogrammes en lumière UV montre des traces insignifiantes de malvine, de même intensité quelle que soit la dilution.

C. — APPLICATION À UN EXTRAIT DE PIVOINE

Les auteurs se sont posés la question de savoir si d'autres diglucosides que celui du malvidol présentaient une « résistance » particulière à la défécation par les métaux lourds.

1^o) *Préparation de l'extrait de pivoine rouge*

Des pétales de pivoine rouge ont été ramassés, séchés à l'abri du soleil ; et conservés en bocal à l'abri de la lumière. Au bout de six mois les pétales sont encore parfaitement rouges.

La préparation a été faite selon le procédé rapporté par DEIBNER (L. DEIBNER, 1952), légèrement modifié.

Les opérations de préparation de l'extrait ont été les suivantes :

— 5 grammes de pétales secs sont broyés dans un mortier avec 100 ml d'éthanol à 95°. On décante et centrifuge le liquide qui reste au repos pendant 20 h. Les pectines doivent précipiter.

— On filtre et ajoute 40 ml de chloroforme. Le tout étant introduit dans une boule à décanter. Brasser doucement pendant un quart d'heure. Puis on introduit 100 ml d'eau distillée, en plusieurs fractions. Le chloroforme se sépare en entraînant la chlorophylle et diverses substances indésirables. On sépare les fractions. La fraction anthocyanique est filtrée.

— On concentre sous vide au bain-marie, pour n'avoir que 70-80 ml. On ajoute de l'alcool pour avoir 120 environ. On complète à 100 ml.

— Avec quelques gouttes d'HCl, le milieu est amené à pH 3,15.

— Les défécations par le mercure, le plomb (E. NÈGRE) et le zinc seront faites sur ce liquide, selon les techniques décrites précédemment.

2^o) Résultats des défécations

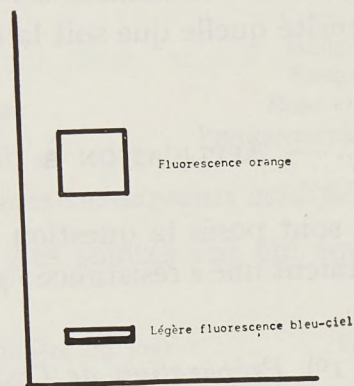
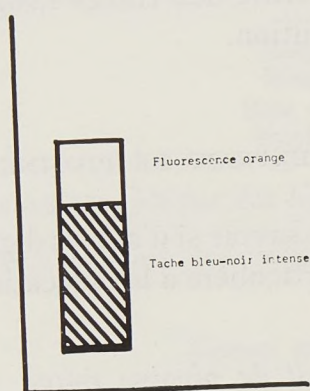
Les liquides surnageants étant acidifiés et ramenés à des dilutions équivalentes, on constate que :

- tous les liquides surnageants sont de teinte rose brique ou orange.
- l'intensité colorante croissante est dans l'ordre : mercure, plomb, zinc, ce qui revient à dire que le mercure est plus défécant que le plomb et à fortiori que le zinc.

— l'examen des chromatogrammes en lumière du jour, et mieux en lumière UV, confirme ce qui précède.

Si l'on compare un chromatogramme réalisé en direct sur l'extrait de pivoine, avec les chromatogrammes provenant des liquides surnageants, on constate :

- que l'extrait d'origine présente deux taches distinctes.
- une fluorescence orange : le diglucoside du paeonidol (paeonine).
- une tache bleu-noir intense à la base du chromatogramme (voir fig. 1)
- que les liquides surnageant les défécats présentent une seule tache fluorescente orange (voir fig. 2).



Toutefois le plomb et le zinc possèdent en supplément une très légère fluorescence bleu ciel située à la base des chromatogrammes.

Quoi qu'il en soit, les trois métaux n'ont pu précipiter la paeonine. Le métal le moins actif ayant été encore le zinc.

IV — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A. — ESSAIS DE DÉCOLORATION DES VINS

On peut résumer ce qui précède de la façon suivante :

- une défécation estimée satisfaisante s'exprimera par le signe +
- une défécation insuffisante, par le signe —
- une défécation aux limites des possibilités de la méthode par le signe ±.

1^o) Type de V. vinifera à jus blanc et hybrides sans malvine

Rapport de dilution des vins	Mercure	Plomb E. NÈGRE	Plomb O. I. V.	Zinc
—	—	—	—	—
5/5	+	+	±	±

2°) *Type teinturiers sans malvine*

Rapport de dilution des vins	Mercure	Plomb E. NÈGRE	Plomb O. I. V.	Zinc
—	—	—	—	—
5/5	+	+	—	—
4/5	+	+	—	—
3/5	+	+	—	—
2/5	+	+	—	—
1/5	+	+	±	—
			+	±

3°) *Type hybrides à malvine*

Rapport de dilution des vins	Mercure	Plomb E. NÈGRE	Plomb O. I. V.	Zinc
—	—	—	—	—
5/5	±	±	—	—
4/5	+	+	—	—
3/5	+	+	—	—
2/5	+	+	—	—
1/5	+	+	—	—
			±	—

Ces tableaux ont été établis en tenant compte de l'appréciation visuelle des liquides surnageants acidifiés et de leurs examens chromatographiques.

Il en résulte que :

— les monoglucosides sont plus facilement précipités que la malvine quel que soit le réactif ;

— le mercure et le plomb en milieu basique (E. NÈGRE) ont une action comparable vis-à-vis de la malvine ;

— le mercure et le plomb (E. NÈGRE) sont plus actifs que le plomb (méthode internationale) et ce dernier est lui-même plus actif que le zinc vis-à-vis des monoglucosides et diglucosides ;

— le mercure et le plomb ont une action quantitative vis-à-vis de la malvine ;

— le zinc n'a pratiquement aucune action sur la malvine ; et une influence limitée à l'égard de certaines matières colorantes des cépages teinturiers ;

— le mercure et le plomb en milieu basique (E. NÈGRE) semblent donner satisfaction bien qu'à la limite de leurs possibilités, dans le cas de l'Oberlin, cépage particulièrement riche en malvine.

Il semble cependant nécessaire d'augmenter les doses de réactif pour avoir un entraînement total de la malvine.

Dans ces conditions : 7 à 8 ml de réactif mercurique

6 à 7 ml d'acétate de plomb

doivent suffire à la défécation intégrale.

— le réactif plombique de la méthode internationale, exige d'être employé à une dose au moins quintuple de celle prévue dans la méthode. Il semble préférable dans ces conditions, de s'orienter vers la méthode au mercure ;

— quant au zinc, il n'est pas utilisé pour précipiter totalement les anthocyanes contenues dans le vin ; mais seulement les substances colorées ou non constituant les Oenotannins, selon E. NÈGRE.

Le présent travail a pris sa source dans l'essai de définition et de classification des vins blancs, rosés et rouges. Au cours des échanges de vue entre spécialistes essayant de définir ces divers vins, le rapport T/P a été proposé comme l'une des bases de classification.

Dans sa thèse E. NÈGRE indique qu'il précipite les Œnotanins, comprenant les Tanins vrais + certaines matières colorantes, par le zinc ammoniacal. Il appelle cette fraction T.

Le présent travail a montré que les matières colorantes des vins issus de *V. vinifera* à jus blanc et d'hybrides sans malvine sont précipitées en totalité ou en presque totalité, alors que la malvine est réfractaire à cette précipitation. La malvine, au regard de la thèse de E. NÈGRE, ne serait donc pas un tanin.

D'autre part, le plomb, selon sa méthode, précipite les polyphénols totaux, donnés de façon indirecte et représentant une valeur que les auteurs appelleront Pt. Il a été signalé que cette précipitation n'est pas comparable à celle de la méthode de la Convention Internationale ; elle se réalise en milieu fortement alcalin, et elle entraîne d'une façon presque totale la malvine. Compte tenu des constatations précédentes, et en schématisant les explications de E. NÈGRE, dans le cas d'un vin de *V. vinifera* (Aramon par exemple) on aurait :

$$Pt = \underbrace{\text{Tanins} + \text{monoglucosides}}_T + \underbrace{\text{Polyphénols non tanins}}_P$$

Dans le cas d'un hybride à malvine les choses sont différentes ; le schéma pourra se présenter de la façon suivante :

$$Pt = \underbrace{\text{Tanins} + \text{monoglucosides}}_T + \underbrace{\text{malvine}}_M + \underbrace{\text{Polyphénols non tanins}}_P$$

$$P + M$$

La somme $P + M$ devrait correspondre à la valeur P établie par E. NÈGRE. Les auteurs n'ont pas expérimenté pour établir si la malvine est ou non un polyphénol tanin.

Dans le cas où M serait un polyphénol tanin, il conviendrait de l'ajouter à la valeur T (donnée par la précipitation au zinc) et à la retrancher de la valeur P (donnée par la précipitation au plomb). Le rapport T/P du professeur NÈGRE devenant $\frac{T (+ M)}{P (- M)}$.

Dans le cas où M serait un polyphénol non tanin, le rapport T/P NÈGRE deviendrait $\frac{T}{P (+ M)}$ (résultat effectif de la méthode).

Il est évident que le rapport T/P reste valable dans le cas des cépages de *V. vinifera* et d'hybrides sans malvine. La discussion et la révision du rapport prend effet lorsque la malvine est présente.

M peut prendre une valeur excessivement importante dans certains cas et donner des valeurs T/P aberrantes.

A titre indicatif, voici quelques résultats chiffrés destinés à démontrer ces anomalies.

	Oberlin non macéré	Oberlin macéré
Polyphénols totaux = Pt.	1,323	4,242
Enotanins = T	0,084	0,441
Polyphénols non tanins = P	1,239	3,801
T/P (selon E. NÈGRE)..... ..	→ 0	0,12

Ces rapports sont anormaux, au regard de la teinte réelle des vins et du type de fabrication.

Le problème se pose du dosage de M ; ce pourrait être l'objet d'un travail à venir.

Enfin, T/P semble valable à l'égard des vins de *V. vinifera* et hybrides sans malvine ; mais il subsiste un doute en ce qui concerne son application aux cépages teinturiers vrais, par opposition à ceux qualifiés par GALLET de 1/2 teinturiers (GALLET P. 1956). Pour définir ou classer les divers types de vins il faut : soit créer une méthode nouvelle permettant sa détermination de façon générale, soit s'orienter vers un autre élément analytique. Il semble totalement impossible de définir la couleur des vins en recherchant une valeur analytique ignorant la réalité de leur teinte.

Il semble possible d'utiliser le rapport T/P sous réserve de modifications relativement à la valeur de la malvine.

En application des constatations précédentes, on peut penser à la possibilité de la purification des colorants diglucosidiques, grâce à l'incapacité totale ou partielle du zinc et du plomb à les précipiter.

Toutefois, le plomb précipite mieux les monoglucosides, et d'autre part il est très facile d'éliminer son excès par l'acide oxalique, de telle sorte que le plomb est préférable au zinc. Les conditions de la purification restent d'ailleurs à préciser.

B. — ESSAI DE DÉCOLORATION DE L'EXTRAIT DE PIVOINE

Les conclusions relatives à la défécation des vins riches en malvine sont applicables à la défécation de la paeonine contenue dans l'extrait de pivoine. C'est le mercure qui est le plus actif et le zinc le moins.

L'entraînement de ce colorant par le mercure est moins complet que celui de la malvine ; peut-être est-ce dû au fait que la quantité de paeonine était supérieure à celle de malvine. Il n'est pas possible de le préciser.

Le zinc s'est montré presque totalement inapte à précipiter la paeonine.

Reçu pour publication en février 1963.

SUMMARY

THE BLEACHING OF RED WINES BY CERTAIN HEAVY METAL SALTS

The authors had submitted wines made from the colourless or coloured juices of *V. vinifera* or from hybrids with or without malvine to comparative qualitative treatment with the salts of the heavy metals, zinc, mercury and lead.

An extract of peony was also tested under the same conditions.

Results led to the conclusion that those anthocyanins which were resistant to clarification were mainly the diglucosides of malvidol and paeonidol, while the resistance of the monoglucosides appeared to be a function above all of their concentration.

Finally the authors made a study of the T/P ratio recommended by Professor NÈGRE for distinguishing between certain types of wine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DEIBNER L., 1952. Documentation sur l'« État actuel du dosage direct des substances colorantes du raisin et du vin rouge d'après les récents travaux ». *Ann. Technol. Agric.*, **1**, 345-357.
- GALET P., 1956. *Cépages et Vignobles de France*. Tome I, p. 475. S 5437 ; Tome II, p. 718 — Alicante, H. Bouschet. Imprimerie Paul DEHAN. Montpellier.
- JAULMES, NEY, 1960. Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Fals. Fraudes*, **616**, 180-183.
- NÈGRE E., 1939. Comment distinguer les vins rosés et les vins de café des vins rouges? *C. R. Acad. Agric.*, **18**, 650.
- NÈGRE E., 1942. Les matières tannoïdes et la composition des vins. *Bulletin de l'Office International du Vin*, 22-52.
- NÈGRE E., 1945. Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin. *Thèses*. Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg. Strasbourg.
- PLUCHON J. P., 1937. Modification à la méthode de défécation des vins par le réactif au sulfate mercurique. *Ann. Fals. Fraudes*, n° **343-344**, 344-350.
- SEMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Fals. Fraudes*, **208**, 208-226.
-

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EAUX-DE-VIE D'ARMAGNAC PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

M. FLANZY et C. JOURET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

L'analyse des eaux-de-vie a un double objet : d'abord en déceler les constituants fondamentaux, ensuite déterminer les éléments caractéristiques de chaque type d'eau-de-vie.

Les méthodes analytiques classiques ont permis de distinguer l'ensemble des eaux-de-vie des autres catégories d'alcools, mais il devenait très difficile de caractériser analytiquement une eau-de-vie définie, Armagnac, par exemple.

Que peut-on attendre de l'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des eaux-de-vie ? C'est pour répondre à cette question que l'on a étudié par cette technique 7 eaux-de-vie d'Armagnac provenant de 3 cépages différents des récoltes 1945 et 1952.

I. — INTRODUCTION

L'un d'entre nous, en collaboration avec M^{lle} LAMAZOU-BETBEDER (1938), avait étudié une première fois la composition des eaux-de-vie d'Armagnac. Ces études préliminaires furent suivies d'un programme systématique d'expérimentation sur l'eau-de-vie d'Armagnac qui malheureusement n'a pu être mis en train.

Depuis, la technique de chromatographie en phase gazeuse ouvre de nouvelles possibilités sur la connaissance des eaux-de-vie en général et des eaux-de-vie d'Armagnac en particulier. La recherche d'éléments caractéristiques des eaux-de-vie de vin répond non seulement à un souci de connaissance mais à l'impératif d'originalité et de défense du produit correspondant.

C'est la raison des travaux qui vont être exposés. Ils ont pour objet d'essayer de préciser, dans la mesure du possible, par le dosage des produits volatils des eaux-de-vie à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse, les différences organolep-

tiques trouvées dans sept échantillons d'Armagnac provenant de trois cépages : *Baco 22 A*, *Folle Blanche* et *Ugni blanc* (*Saint-Emilion des Charentes*).

Une série d'échantillons est de la récolte de 1945, une autre de celle de 1952.

En outre, les deux échantillons de *Baco 22 A* de 1952 sont d'origine géographique différente.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

APPAREILLAGE

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse utilisé est le modèle de laboratoire type 49 fabriqué par MECL.

Cet appareil est équipé d'un détecteur à conduction thermique (catharomètre) ; l'introduction de l'échantillon à analyser se fait par micropipettes de 0,1 à 50 μ l et entraînement par le gaz vecteur.

On a utilisé comme gaz vecteur l'hydrogène qui donne une meilleure sensibilité avec le détecteur à thermoconduction.

Pour les colonnes, le support solide était constitué par du chromosorb 30-60 mesh.

La nature de la phase stationnaire, la température, le débit du gaz, varient avec les corps à séparer.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

FOUASSIN (1959) introduit directement dans l'appareil (de marque FRACTOVAP C. ERBA) des quantités de distillat d'eau-de-vie de l'ordre de 150 μ l. Pour le dosage des alcools supérieurs et de l'acétal, cet auteur se débarrasse de la majeure partie de l'eau par relarguage par CO_3K_2 . Ces deux techniques n'ont pu être appliquées à notre appareil.

Il a fallu éliminer l'eau et une grande partie de l'éthanol car les composés (alcools supérieurs et esters) qui doivent être dosés sont dans la proportion de 1 p. 100 et souvent moins, comparativement à l'éthanol.

L'élimination nécessaire a été faite suivant la technique de MECKE cité par BARAUD (1961) : 250 ml d'Armagnac sont extraits par trois fois 100 ml d'azéotrope éther/pentane (obtenu en distillant 2 parties d'éther sulfurique et 1 partie de pentane). L'extract est lavé 4 fois avec 50 ml d'eau pour éliminer la plus grande partie de l'éthanol qui passe dans la phase aqueuse. Un seul lavage par 50 ml d'eau comme l'indique BARAUD a laissé une trop forte proportion d'éthanol.

On sèche pendant une nuit sur CaCl_2 .

On concentre ensuite au bain-marie à 35°C jusqu'à 1 ml environ (une concentration moins poussée conservant un trop fort pourcentage d'azéotrope éther/pentane dans l'extract).

SÉPARATION DES ALCOOLS

On utilise une colonne de 4,50 m à 33 p. 100 d'Armeen S D (amines supérieures. Cf. ZERAMBO J. E. et LYSYJ I., 1959) à la température de 100°C.

La pression d'entrée est de 0,45 kg/cm^2 , le débit de 5 litres/heure. La durée de l'analyse est de 1 heure 10. Passent dans l'ordre : éthanol, isopropanol, propanol, butanol secondaire, isobutanol, butanol primaire, isopentanol, pentanol.

Les traces d'eau restantes passent avant l'éthanol et masquent le méthanol. Le dosage de cet alcool est d'autre part pratiquement impossible dans les conditions expérimentales indiquées du fait de sa mauvaise extraction par l'azéotrope et du lavage à l'eau qui l'élimine en même temps que l'éthanol.

L'acétate d'éthyle masque en partie l'isopropanol et plusieurs esters, dont l'acétate d'isoamyle, interfèrent avec le butanol secondaire.

SÉPARATION DES ALCOOLS ET DES ESTERS LÉGERS

Une colonne de 3 m à 30 p. 100 de triéthanolamine est utilisée. La température est de 95°C et la pression d'entrée de 0,30 kg/cm² avec un débit de 3,4 l/h. La durée du dosage est de 45 minutes.

Passent dans l'ordre : acétal, acétate d'éthyle, propionate d'éthyle, acétate d'isobutyle, acétate d'isoamyle, méthanol, éthanol, butanol secondaire, propanol, isobutanol, butanol primaire, isopentanol (les alcools isoamyliques actif et inactif sont mal séparés) et pentanol ; l'eau est rejetée après le pentanol.

SÉPARATION DES ESTERS SUPÉRIEURS

Une colonne de 1,5 mètre de sébacate de polypropylène-glycol à 30 p. 100 est suivie d'une colonne de 1,50 m de polyéthylène glycol à 25 p. 100 (carbowax 1500). La température est de 220°C, la pression d'entrée de 1 kg/cm², et le débit de 3 l/h.

Les esters légers et les alcools sont rapidement éliminés ; les esters lourds sortent dans l'ordre de leur point d'ébullition du caproate d'éthyle au palmitate d'éthyle. La durée du dosage est de 1 h 30.

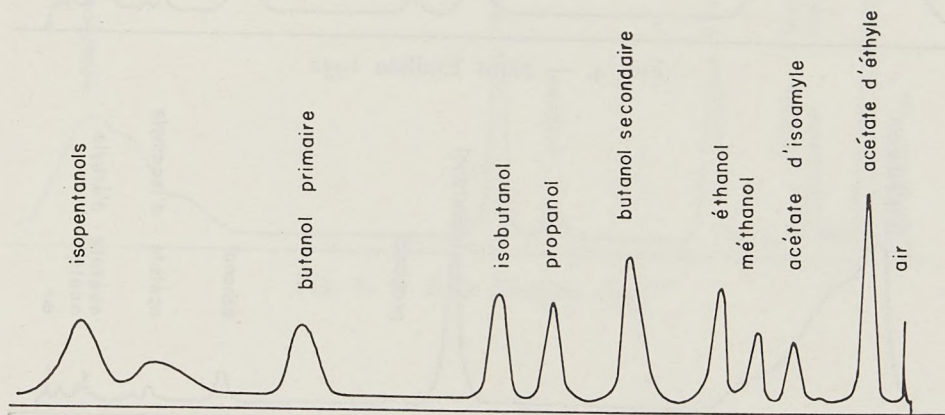
III. — RÉSULTATS

On a établi les chromatogrammes comme il est dit plus haut et mesuré les proportions respectives des constituants analysés.

CHROMATOGRAMMES

Les phases stationnaires utilisées fournissent un diagramme de courbes symétriques sauf pour les isopentanol sur triéthanolamine ; dans ce dernier cas, les deux pics des isopentanol actif et inactif sont mal séparés et causent une dissymétrie marquée.

On a reproduit ci-après les chromatogrammes obtenus pour le dosage des alcools et esters légers à l'aide de la colonne de triéthanolamine ainsi que ceux du dosage des esters supérieurs à l'aide de la colonne mixte sébacate de polypropylène glycol et carbowax 1500.

Alcools et esters légersFIG. 1. — *Solution témoin*

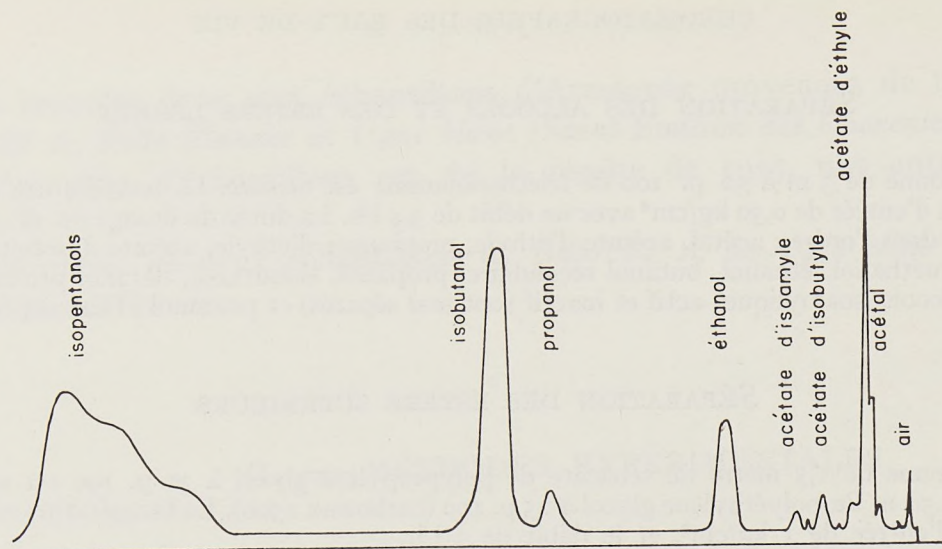


FIG. 2. — Folle blanche 1952

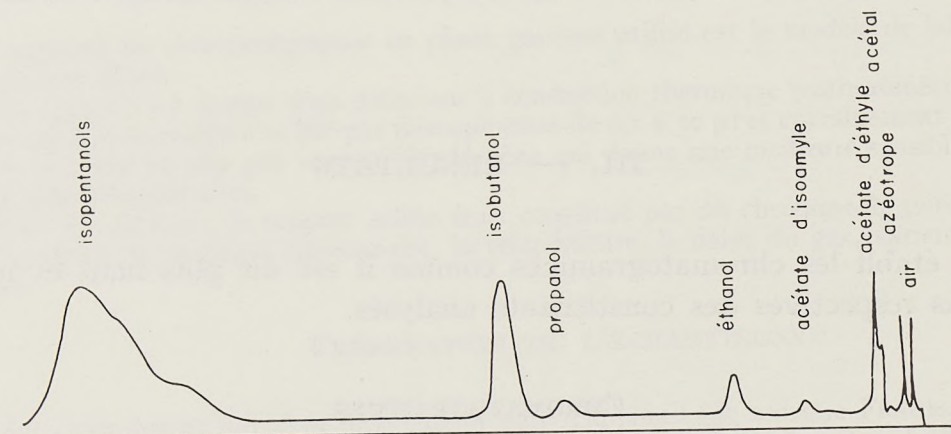


FIG. 3. — Baco 22 A, *Panjas*, 1952

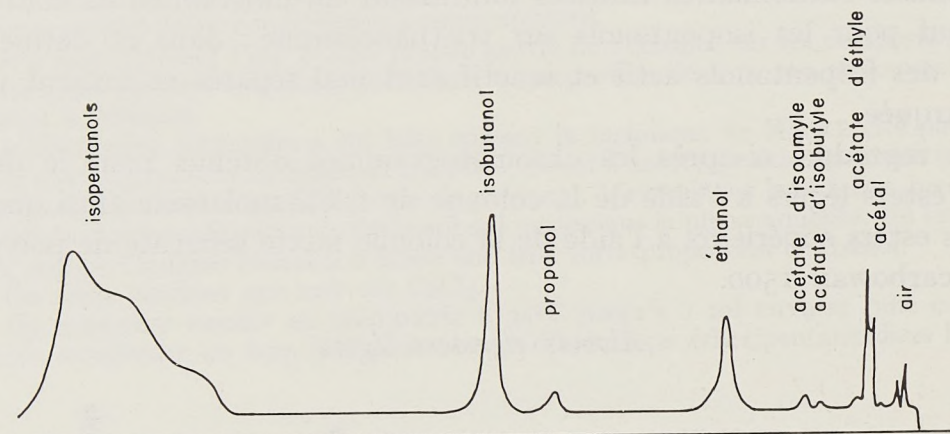


FIG. 4. — Saint Émilien 1952

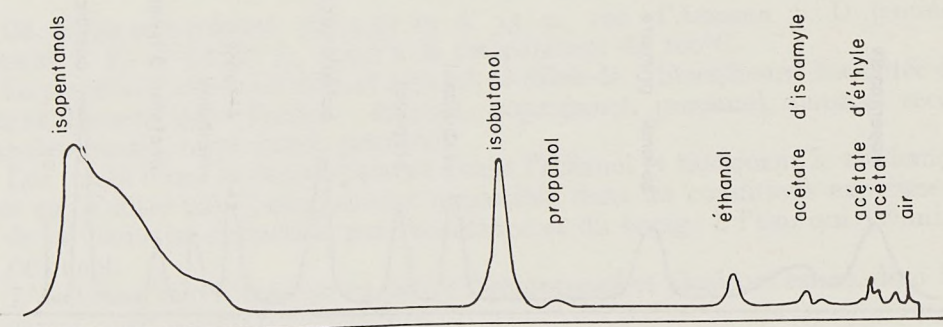


FIG. 5. — Baco 22 A, *Arthez*, 1952

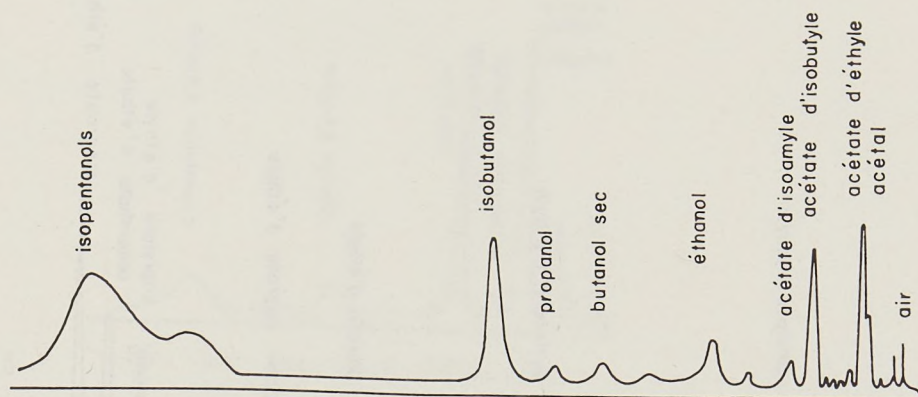


FIG. 6. — Saint Émilion 1945

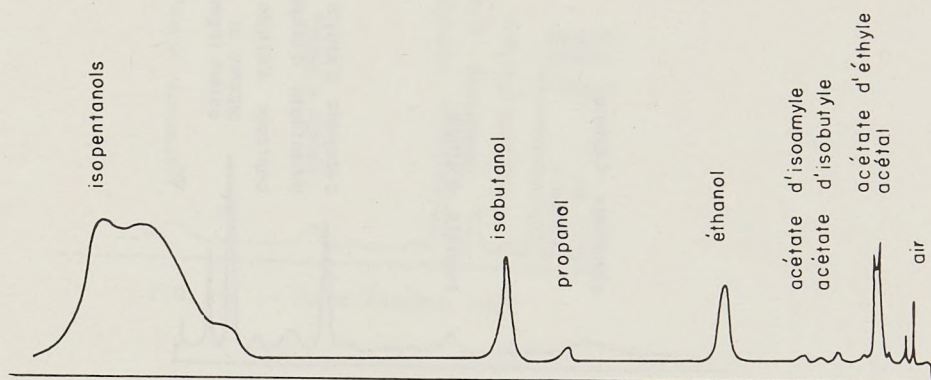


FIG. 7. — Baco 22 A 1945

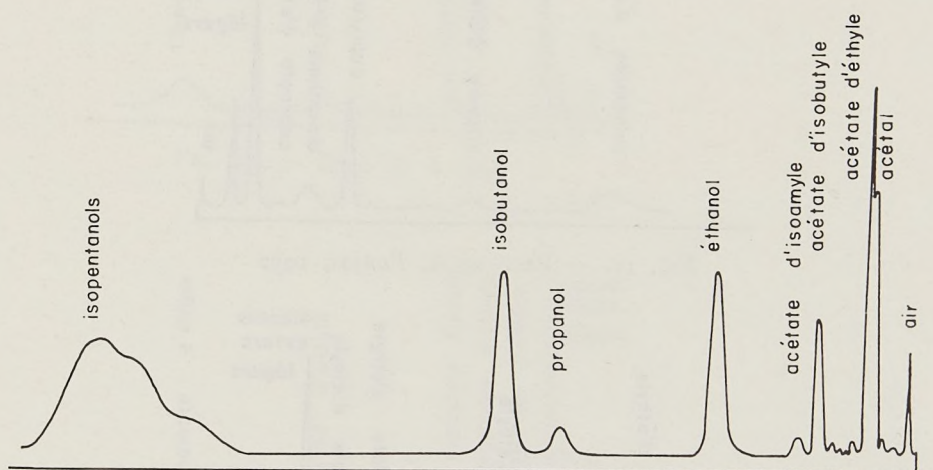
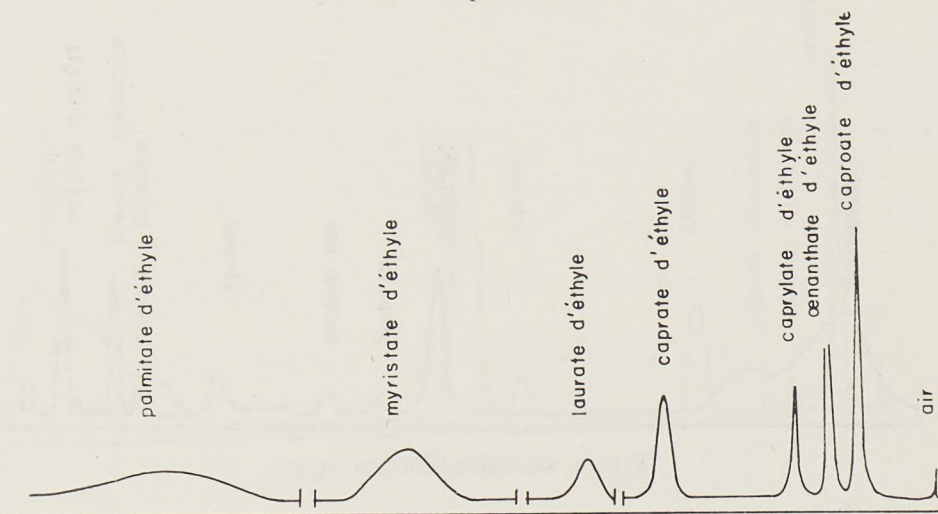
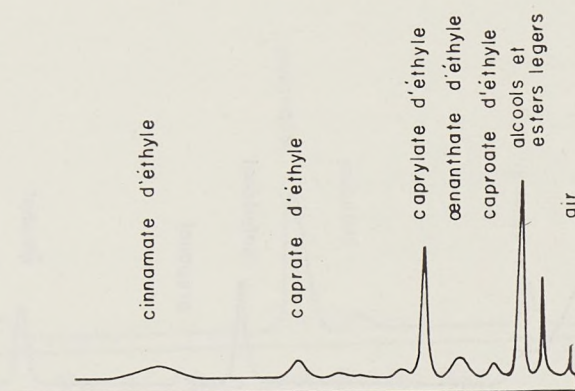
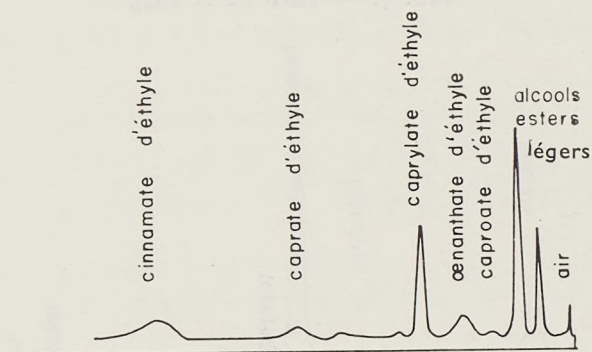
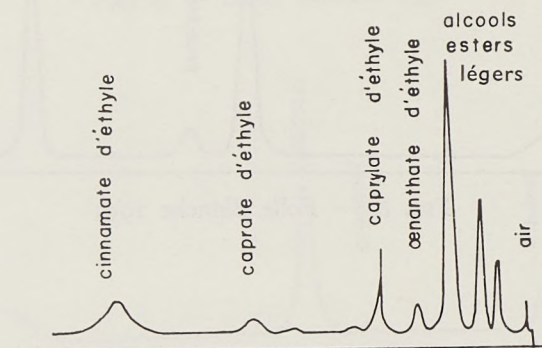


FIG. 8. — Folle Blanche 1945

Esters supérieursFIG. 9. — *Solution témoin*FIG. 10. — *Folle blanche 1952*FIG. 11. — *Baco 22 A, Panjas, 1952*FIG. 12. — *Saint Émilion 1952*

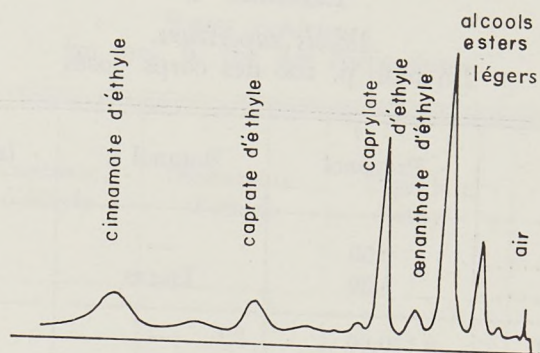


FIG. 13. — Baco 22 A, Arthez, 1952

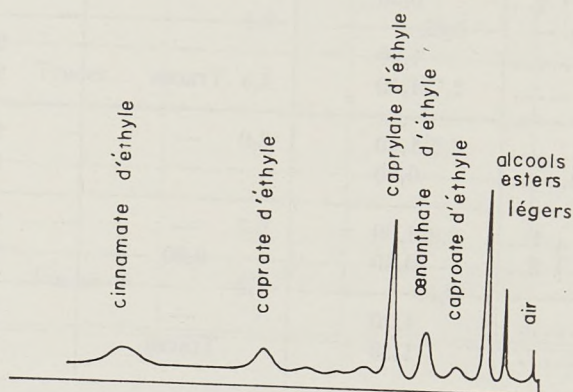


FIG. 14. — Saint Émilion 1945

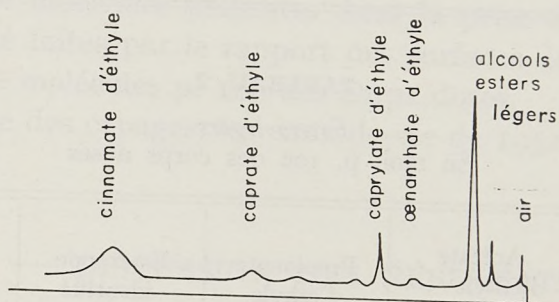


FIG. 15. — Baco 22 A 1945

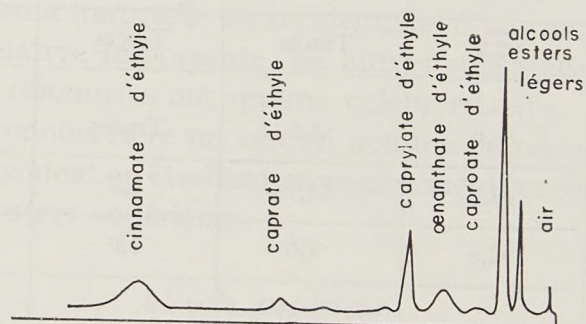


FIG. 16. — Folle blanche 1945

TABLÉAU I
Alcools supérieurs
 En mol. p. 100 des corps dosés

	Propanol	Butanol 2	Isobutanol	Isopentanol
<i>Baco 22 A</i> , 1952 Arthez { 1.....	0,50	—	11,50	88,00
2.....	0,30	Traces	8,30	91,40
<i>Baco 22 A</i> , 1952 Panjas { 1.....	0,60	—	11,60	87,80
2.....	0,50	Traces	10,80	88,70
<i>St-Emilion des Charentes</i> , 1952 { 1..	0,40	—	11,00	88,60
2..	0,50	—	11,50	88,00
<i>Folle Blanche</i> 1952 { 1.....	1,60	—	23,60	74,80
2.....	1,10	Traces	18,90	80,00
<i>Baco 22 A</i> , 1945 Arthez { 1.....	1,40	—	13,60	85,00
2.....	0,90	—	11,70	87,40
<i>St-Emilion des Charentes</i> 1945 { 1..	1,00	—	14,40	84,60
2..	0,60	0,80	14,70	83,90
<i>Folle Blanche</i> 1945 { 1.....	1,20	—	17,00	81,80
2.....	1,10	Traces	27,0	71,90

(1) — Dosage sur armeen.

(2) — Dosage sur triéthanolamine.

TABLÉAU 2
Esters légers
 En mol. p. 100 des corps dosés

	Acétate d'éthyle + acétal	Propionate d'éthyle	Ester non identifié	Acétate d'isobutyle	Acétate d'isoamyle
<i>Baco 22 A</i> Arthez, 1952 .	40,4	Traces	Traces	5,8	53,8
<i>Baco 22 A</i> Panjas, 1952 .	92,2	Traces	Traces	—	7,8
<i>St-Emilion des Charentes</i> 1952	86,0	5,8	Traces	2,0	6,2
<i>Folle Blanche</i> 1952.....	80,2	10,7	4,3	1,6	3,2
<i>Baco 22 A</i> , Arthez 1945 .	92,8	1,0	1,0	Traces	5,2
<i>St-Emilion des Charentes</i> 1945	50,7	9,1	5,2	27,7	7,3
<i>Folle Blanche</i> 1945.....	84,5	7,7	0,5	6,1	1,2

TABLEAU 3
Esters supérieurs
 En mol. p. 100 des corps dosés

	Caproate d'éthyle	Enanthate d'éthyle	Caprylate d'éthyle	Caprate d'éthyle	Ester non identifié (cinnamate d'éthyle?)
<i>Baco 22 A 1952, Arthez ...</i>	—	3,2	42,9	11,7	42,2
<i>Baco 22 A 1952, Panjas ...</i>	Traces	8,7	44,0	13,0	34,3
<i>St-Emilion des Charentes 1952</i>	—	6,2	28,5	7,5	57,8
<i>Folle Blanche 1952.....</i>	Traces	6,8	57,3	15,4	20,5
<i>Baco 22 A 1945, Arthez ...</i>	—	0,8	25,3	7,4	66,5
<i>St-Emilion des Charentes 1945</i>	—	5,2	28,3	5,7	60,8
<i>Folle Blanche 1945.....</i>	Traces	6,7	44,7	12,7	35,9

MESURES

Dans les conditions expérimentales utilisées, les surfaces des pics sont proportionnelles au nombre de molécules présentes dans la prise d'essai.

Les mesures ont été faites par le rapport des surfaces des pics et les résultats suivants sont donnés en molécules p. 100 des corps dosés.

Dans le même ordre des cépages, les eaux-de-vie de 1952 sont suivies de celles de 1945.

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

Avant d'analyser les résultats obtenus, nous insisterons sur le fait que les chiffres des dosages sont donnés en pourcentage des corps détectés et que, par suite, la diminution de taux (naturelle ou accidentelle) d'un composé peut augmenter, dans une proportion relative importante, les autres substances présentes. Dans ces conditions les résultats obtenus n'ont qu'une valeur relative.

Nous pouvons néanmoins faire un certain nombre de remarques sur les cépages et sur l'action du vieillissement en étudiant successivement les compositions en alcools, en esters légers et en esters supérieurs.

Alcools supérieurs

Les mesures ont été faites sur deux extraits différents des échantillons et à l'aide de deux phases fixes différentes (Armeen et triéthanolamine).

Les chiffres trouvés varient dans certains cas pour le même échantillon dans

des proportions importantes. La reproductibilité de l'appareil étant très bonne, des différences proviennent du fait que dans le cas de l'Armeen les esters interfèrent. Il n'est pas exclu que l'extraction n'influe pas également.

Au point de vue cépages. — Les eaux-de-vie de *Folle Blanche*, à l'inverse des eaux-de-vie de *Baco* et *St-Emilion*, contiennent dans nos essais des doses de propanol et d'isobutanol proportionnellement plus importantes que celles des isopentanol.

Le butanol secondaire, produit normal de la fermentation vinaire, n'a été trouvé en quantité notable que dans un échantillon (*St-Emilion* 1945). Ce corps a été décelé sous forme de traces dans 4 autres échantillons et n'a pas été détecté dans les eaux-de-vie de *Saint-Emilion* 1952 et *Baco Arthez* 1945.

Le vieillissement semble diminuer le taux des isopentanol en faveur des alcools plus légers, mais cette hypothèse demande à être vérifiée car il ne s'agit pas d'une même eau-de-vie initiale et les conditions de l'année (composition du moût, fermentation et, dans une certaine mesure, distillation) jouent certainement un grand rôle.

Esters légers

On peut remarquer tout d'abord que :

— les teneurs en acétate d'éthyle sont très fortes proportionnellement aux autres esters légers sauf pour le *Baco Arthez* 1952.

— les doses d'acétate d'éthyle varient suivant les échantillons et ne semblent pas constituer un élément distinctif des cépages. Elles doivent plutôt dépendre de l'état initial du vin et du mode de distillation.

D'autre part, dans les eaux-de-vie des cépages *vinifera* le propionate d'éthyle est en proportion plus grande que dans celles de l'hybride *Baco*.

Les échantillons de *Folle Blanche* se distinguent des autres par leur faiblesse relative en acétate d'isoamyle ; dans tous les cas, les eaux-de-vie de *Folle Blanche* contiennent dans cet échantillonnage une gamme d'esters plus diversifiée et mieux répartie en proportions.

En comparant les diagrammes des eaux-de-vie d'âge différent, on peut noter que le vieillissement amène une augmentation du nombre des composés légers (esters, aldéhydes, etc.) dont certains existent sous forme de traces et n'ont pu être identifiés. Cette variation est surtout sensible pour les cépages *vinifera*.

Esters gras supérieurs

On peut noter que le laurate d'éthyle n'a pas été décelé pas plus que les autres esters gras d'éthyle de poids moléculaire supérieur bien que laurate, myristate et palmitate d'éthyle soient bien séparés en solution pure avec les données expérimentales utilisées. Un ester non identifié, peut-être le cinnamate d'éthyle cité par MECKE, se place en quantité importante entre le pic du caprate et celui du laurate.

Le caproate se trouve sous forme de traces dans certains extraits ; son dosage est difficile car le pic se trouve près de celui de l'éthanol et des autres composés de plus bas poids moléculaire, dans une partie du diagramme qui nécessite un changement de la sensibilité du détecteur.

On peut remarquer que l'eau-de-vie provenant de la *Folle Blanche* est plus riche en esters gras supérieurs de bas poids moléculaire (caprylate et caprate d'éthyle) et la moins pourvue proportionnellement en ester gras non identifié. L'échantillon de *Baco* de Panjas 1952 montre un certain parallélisme de composition avec celui de *Folle Blanche*, dans la répartition des différents esters ; c'est également la seule eau-de-vie avec les deux échantillons de *Folle Blanche* qui met nettement en évidence des traces de caproate d'éthyle.

Le vieillissement paraît amener une diminution des esters supérieurs de bas poids moléculaire au profit des plus lourds.

V. — CONCLUSION

Les différences qualitatives et quantitatives entre les compositions chimiques des alcools et des esters des eaux-de-vie examinées sont assez réduites et loin d'être significatives. Il faut bien préciser que les résultats sont donnés en pourcentage des composés dosés et que, par suite, mêmes proportions ne signifient pas nécessairement mêmes quantités dans les eaux-de-vie ; en outre, les résultats sont fragmentaires et demandent à être complétés par un plus grand nombre d'analyses portant sur des eaux-de-vie expérimentales suivies depuis la vinification du raisin jusqu'au stockage en fût en passant par la distillation.

On peut noter cependant, au point de vue cépages, pour les échantillons examinés dans ces essais, que les eaux-de-vie de *Folle Blanche* sont plus riches en esters divers et ont une composition plus « harmonieuse » que les eaux-de-vie de *Baco 22 A* ou de *Saint-Emilion des Charentes*.

Ceci se retrouve à la dégustation où l'eau-de-vie de *Folle Blanche* se révèle la plus fine et possède le meilleur bouquet.

Le vieillissement fait apparaître un certain nombre de corps (aldéhydes, esters, cétones...). Mais comme ils n'ont pas encore été identifiés il est prématuré de voir en eux une caractéristique des Armagnacs.

Par ailleurs, ces nouveaux composés ne semblent pas améliorer la qualité gustative des eaux-de-vie d'Armagnac examinées ; celles-ci paraissent moins fondues et ont un bouquet atténué ; ces constatations, si elles étaient confirmées, seraient quelque peu en contradiction avec les conceptions actuelles. Ces quelques résultats, insuffisants, obligeraient à distinguer deux catégories de phénomènes : des phénomènes améliorants comme l'estérification, d'autres plutôt défavorables comme l'oxydation. Le rôle du bois des fûts de vieillissement est sans nul doute important mais ici encore les effets sont loin d'être précisés.

Remarquons enfin qu'il n'y a pas d'ester gras d'éthyle à partir du laurate ; ce fait tient peut-être à la technique de distillation et à l'appareil utilisé pour l'obtention des eaux-de-vie d'Armagnac analysées. Cela démontre une fois de plus l'importance fondamentale de la distillation sur la composition finale des eaux-de-vie.

Reçu pour publication en janvier 1963.

SUMMARY

A CONTRIBUTION TO THE STUDY OF ARMAGNAC BRANDIES BY
GAS PHASE CHROMATOGRAPHY

A gas phase chromatographic study was made of 7 Armagnac brandies from 3 vine varieties (2 *vinifera* : *Folle Blanche* and *Ugni blanc* ; 1 direct hybrid producer *Baco 22 A*) of different ages (1945 and 1952).

The apparatus used was the laboratory model type 49 of the MECI catharometer. the gas vector being hydrogen and the solid support chromosorb 30-60 mesh. The nature of the stationary phase, the temperature and the gas flow varied with the product under separation.

The alcohols, light and higher esters were fractionated in this way (tables 1,2,3) and the results given in molecular percentages of the compounds tested.

There was little apparent difference in chemical composition between the higher alcohols and the esters.

Ageing caused a certain number of substances to appear which would have to be identified by a later study.

Ethyl laurate was not found : this seemed to be due to the method of distillation employed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARAUD J., 1961. Étude quantitative par chromatographie en phase gazeuse des alcools et esters de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Chim.*, **10**, 1874-1877.
- FLANZY M., LAMAZOU-BETBEDER Marie, 1938. Sur la composition des eaux-de-vie de la région languedocienne. *Ann. Technol. agr.*, **1**, 100-109.
- FLANZY M., LAMAZOU-BETBEDER Marie, 1961. Armagnac. *Vignes et Vins*, **99**, 21.
- FLANZY M., 1961. *La Terre d'Oc*, **43**, 154-163.
- FOUASSIN A., 1959. L'analyse des spiritueux par chromatographie en phase gazeuse. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **14**, 206-212.
- PHILLIPS C., 1956. *Gas chromatography*. London, Butterworths scientific Publications.
- ZAREMBO J. E., LYSYJ I., 1959. Use of a new stationary liquid phase in gas chromatography determination of alcohols in the presence of large amounts of water. *Anal. Chem.*, **31**, 1833-34.
-

NOTE SUR LA COMPOSITION EN MATIÈRES AZOTÉES DES FROMAGES AFFINÉS DE CAMEMBERT, SAINT-PAULIN ET GRUYÈRE DE COMTÉ

J. LENOIR

avec la collaboration technique de Antoinette JOUAN

*Laboratoire de Technologie,
École nationale supérieure agronomique, Grignon (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Sur dix échantillons de fromages affinés de chacun des types Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté, les teneurs en diverses formes d'azote soluble, azote soluble total, azote non protéique, azote soluble dans l'acide phosphotungstique, azote aminé et azote ammoniacal, ont été déterminées.

La composition en matières azotées de chaque type de fromage présente une certaine constance. Par contre des différences significatives entre chacun des types sont notées. Ainsi, l'azote soluble total représente dans le Camembert 31 à 34 p. 100 de l'azote total, dans le Saint-Paulin 16 à 21 p. 100, dans le Gruyère de Comté 28 à 32 p. 100. La composition de cet azote soluble est elle-même sensiblement différente d'un type de fromage à l'autre. Les pourcentages respectifs en azote aminé et en azote ammoniacal sont de 9 à 12 et 21 à 27 dans le Camembert, 13 à 18,5 et 2,7 à 8,5 dans le Saint-Paulin, 32 à 37 et 10,5 à 14,5 dans le Gruyère de Comté (pourcentages rapportés à l'azote soluble total).

INTRODUCTION

Les fromages de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté occupent sur le marché français des produits laitiers une place importante ⁽¹⁾. Les travaux portant sur divers aspects de leur fabrication sont nombreux ; par contre, les données relatives à la protéolyse qui intervient au cours de leur maturation sont rares.

LINDET et AMMANN (1904) ont suivi la solubilisation progressive de l'azote et la formation de l'ammoniaque sur ces trois types de fromages. Ils ont noté des différences très marquées dans la composition des fromages mûrs ; ainsi, les teneurs en azote soluble et en azote ammoniacal (p. 100 de l'azote total) seraient respectivement

⁽¹⁾ Sur une production fromagère voisine de 450 000 tonnes en 1960 le Camembert représente 90 000 tonnes, le Saint-Paulin près de 40 000 tonnes et le Gruyère de Comté 30 000 tonnes (JARROUSSE H. et MOCQUOT G., communication personnelle).

98,3 et 12,2 pour le Camembert, 20,7 et 0,5 pour le Port-Salut, 24 et 1,1 pour le Gruyère. Le matériel étudié par ces auteurs était sans doute assez différent des fabrications actuelles et leurs résultats ne semblent intéresser qu'un petit nombre d'échantillons de chaque type. Aussi ne peut-on considérer ces résultats comme réellement représentatifs. D'ailleurs, des travaux postérieurs (PIEN et MAURICE, 1937) signalent des chiffres qui ne s'accordent guère avec les précédents et, récemment (LENOIR, 1962), nous avons noté sur des Camemberts affinés des teneurs en azote soluble singulièrement moins élevées que celles obtenues par LINDET et AMMANN. Il nous a donc paru intéressant de préciser la composition en matières azotées des fromages mûrs et de rechercher si cette composition était assez constante pour caractériser le type de fromage.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

A. Prélèvement des échantillons

Dix échantillons de chaque type de fromage, dont l'apparence indiquait un degré optimal de maturité et qui présentaient des qualités organoleptiques jugées satisfaisantes, ont été prélevés dans le commerce. Les fromages de Camembert, tous originaires de Normandie, provenaient de plusieurs fromageries et étaient fabriqués à partir de lait cru. Les fromages de Saint-Paulin, commercialisés sous différentes marques ou appellations, étaient préparés avec du lait pasteurisé. Les fromages de Gruyère de Comté répondaient aux exigences de la législation concernant ce produit dont on sait qu'il bénéficie d'une appellation d'origine.

B. Méthodes d'analyses

Après mise en solution dans le citrate de soude (KNUDSEN et OVERBY, 1942 ; MOGENSEN, 1947) d'une partie aliquote du fromage, le fractionnement des matières azotées a été effectué selon la technique antérieurement décrite (LENOIR, 1962). Outre la détermination des formes suivantes : azote total (NT), azote soluble total (NST), azote non protéique (NPN), azote formol (NF) et azote ammoniacal ($N\ NH_3$), l'analyse a comporté une détermination de l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique à 2 p. 100 en milieu sulfurique 2 N (NPT). Cette dernière forme de l'azote peut être assimilée aux composés de faible poids moléculaire, oligopeptides et acides aminés neutres et acides (MOGENSEN, 1947).

RÉSULTATS

Les résultats analytiques sont groupés dans les tableaux 1, 2 et 3. Ces tableaux indiquent les teneurs moyennes des formes solubles de l'azote, les caractéristiques de dispersion de chaque série d'échantillons, écart-type et coefficient de variation et les valeurs probables des moyennes calculées selon la méthode STUDENT-FISHER. Ces diverses données montrent qu'il existe, pour chaque type de fromage, une certaine constance dans les teneurs en azote soluble, constance plus marquée toutefois pour les formes NST et NPN que pour les fractions NPT, NF et $N\ NH_3$. On remarque en outre, que la composition des fromages de Camembert et de Gruyère de Comté varie sensiblement moins d'un échantillon à l'autre que celle des fromages de Saint-Paulin. Cette observation peut, au premier abord, paraître curieuse. En effet, Saint-Paulin est préparé avec du lait pasteurisé et, la coagulation, l'égouttage et

maturation du caillé sont en grande partie l'œuvre de levains lactiques. Il devrait logiquement s'ensuivre une certaine uniformité des caractères analytiques, uniformité de toute façon plus marquée que pour le Camembert normand, fabriqué à partir de lait cru. Cette dispersion relative des résultats concernant le Saint-Paulin est vraisemblablement liée à la diversité des caractères des levains lactiques employés et à l'intervention, dans le processus de maturation de certains échantillons, de microorganismes autres que les bactéries lactiques, microcoques et levures notamment (VEISSEYRE, LENOIR et MARCERON).

Les résultats relatifs aux fromages de Camembert (tableau 1) montrent que

TABLEAU 1
Formes solubles de l'azote du Camembert affiné

Formes de l'azote	Moyenne M (% NT)	Écart-type	Coefficient de variation	M probable t (95) (% NT)
Azote soluble total.....	32,46	1,65	0,050	31,28 — 33,64
Azote non protéique	20,70	1,91	0,092	19,34 — 22,06
Azote phosphotungstique	8,69	1,11	0,128	7,84 — 9,54
Azote formol.....	11,09	1,62	0,146	9,94 — 12,24
Azote ammoniacal	7,73	1,29	0,167	6,81 — 8,65

l'azote total est formé de 31 à 34 p. 100 d'azote soluble, 7,5 à 10 p. 100 d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique et 6,5 à 9 p. 100 d'azote ammoniacal. Ces résultats confirment certaines données publiées antérieurement (JACQUET et LENOIR, 1954 ; LENOIR, 1962) et montrent que la dégradation de la caséine est nettement moins forte que ne l'indiquaient les travaux anciens (LINDET et AMMANN, 1904 ; BOSWORTH, 1907). Les caractères analytiques des fromages de Saint-Paulin (tableau 2) révèlent

TABLEAU 2
Formes solubles de l'azote du Saint-Paulin affiné

Formes de l'azote	Moyenne M (% NT)	Écart-type	Coefficient de variation	M probable t (95) (% NT)
Azote soluble total.....	18,41	2,97	0,161	16,29 — 20,53
Azote non protéique	10,03	2,04	0,204	8,57 — 11,49
Azote phosphotungstique	4,05	1,46	0,365	3,01 — 5,09
Azote formol.....	3,93	1,29	0,331	3,01 — 4,85
Azote ammoniacal	1,03	0,74	0,740	0,50 — 1,56

un taux de protéolyse peu prononcé ; l'azote soluble ne représente que 15,5 à 21,5 p. 100 de l'azote total, l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique 2,5 à 5,5 p. 100 et l'azote ammoniacal 0,3 à 2 p. 100. Ces résultats concordent avec ceux

précédemment cités de LINDET et AMMANN (1904). Quant au Gruyère de Comté (tableau 3), s'il est assez proche du Camembert par ses teneurs en azote soluble (28 à 33 p. 100), en azote non protéique, voire même en azote formol, il s'en distingue par les proportions d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (14,5 à 18,5 p. 100) et d'azote ammoniacal (3 à 4,7 p. 100).

TABLEAU 3

Formes solubles de l'azote du Gruyère de Comté affiné

Formes de l'azote	Moyenne M (% NT)	Écart-type	Coefficient de variation	M probable t (95) (% NT)
Azote soluble total	30,23	2,40	0,079	28,52 — 31,94
Azote non protéique	23,97	2,61	0,109	22,10 — 25,84
Azote phosphotungstique	16,42	1,92	0,117	15,05 — 17,79
Azote formol.....	14,23	1,58	0,111	13,10 — 15,36
Azote ammoniacal	3,81	0,86	0,230	3,20 — 4,42

Les différences de composition entre ces trois types de fromage apparaissent plus clairement si l'on envisage les diverses fractions azotées (tableau 4). On constate notamment que le Saint-Paulin, qui présente la teneur la plus élevée en N caséine (plus de 80 p. 100, alors que le Camembert et le Gruyère de Comté en contiennent un peu moins de 70 p. 100), est aussi le fromage dont l'azote soluble a subi la dégradation la moins profonde. L'azote soluble du Camembert est déjà plus riche en fractions simples ; il contient en effet moins d'azote protéose et plus d'azote ammoniacal.

TABLEAU 4

Composition azotée moyenne des fromages de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté

Formes de l'azote ⁽¹⁾	% NT			% NST		
	Camembert	Saint-Paulin	Gruyère de Comté	Camembert	Saint-Paulin	Gruyère de Comté
N Caséine	67,5	81,6	69,8	—	—	—
N Protéose	11,8	8,4	6,3	36,2	45,5	20,7
N Peptide	9,6	6,1	9,7	29,6	33,1	32,2
N Aminé	3,4	2,9	10,4	10,3	15,7	34,4
N Ammoniacal	7,7	1,0	3,8	23,8	5,6	12,6

⁽¹⁾ N Caséine = NT — NST ;
 N Protéose = NST — NPN ;
 N Peptide = NPN — NF ;
 N Aminé = NF — N NH₃.

Plus simplifié aussi est l'azote du Gruyère de Comté dans lequel l'azote formol représente plus de 45 p. 100 de l'azote soluble et l'azote aminé près de 75 p. 100 de l'azote formol.

DISCUSSION

Les fromages étudiés, Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté, sont effectivement caractérisés par leur composition en matières azotées. Pour un même type de fromage, cette composition varie relativement peu d'un échantillon à l'autre et les teneurs moyennes en diverses formes de l'azote trouvées dans ce travail peuvent être considérées comme représentatives du type de fromage étudié. Des différences significatives entre chacun des types sont, par contre, mises en évidence. Ces différences ne portent pas seulement sur « l'étendue » de la protéolyse concrétisée par les teneurs en azote soluble total, elles portent aussi sur la « qualité » de cette protéolyse exprimée par les taux des diverses fractions azotées solubles : protéoses, peptides, acides aminés et ammoniacale. Parmi les caractères distinctifs particulièrement marquants on peut retenir les teneurs en azote soluble total, en azote aminé et en azote ammoniacal, et le rapport N aminé/N ammoniacal. Le tableau 5 résume ces caractères.

TABLEAU 5

*Caractères distinctifs des fromages de Camembert,
Saint-Paulin et Gruyère de Comté*

	Camembert	Saint-Paulin	Gruyère de Comté
N soluble total ⁽¹⁾	31 — 34	16 — 21	28 — 32
N aminé ⁽²⁾	9 — 12	13 — 18,5	32 — 37
N ammoniacal ⁽²⁾	21 — 27	2,7 — 8,5	10,5 — 14,5
N aminé/N ammoniacal	0,35 — 0,50	2,1 — 7,5	2,4 — 3,3

⁽¹⁾ % de l'azote total ;

⁽²⁾ % de l'azote soluble total.

La composition en matières azotées d'un fromage affiné n'est que la traduction de l'activité, au cours de la fabrication et de la maturation, des agents responsables de la dégradation des protéines, la présure et les microorganismes. En ce qui concerne le rôle possible des microorganismes on remarque que les fromages dont la maturation est surtout l'œuvre de bactéries lactiques (Saint-Paulin et Gruyère de Comté) contiennent peu d'azote ammoniacal et relativement beaucoup d'azote aminé. Par contre, ceux du type Camembert, dont l'affinage est l'œuvre d'une flore complexe au sein de laquelle moisissures, levures et microcoques jouent un rôle dominant, présentent un rapport N aminé/N ammoniacal très inférieur à 1. Ces différences peuvent être attribuées à l'activité des désaminases d'origine microbienne, activité qui ne se manifeste nettement que dans les fromages à pâte molle (RAIBAUD et *al.*,

1959). Comme par ailleurs, certaines observations (VEISSEYRE, LENOIR et PIERRE) ont montré que les acides diaminés libres étaient, en pourcentage relatif, moins abondants dans le Camembert que dans le Saint-Paulin ou le Gruyère de Comté, on peut penser que la désamination porte principalement sur ces acides diaminés. On note également que le Saint-Paulin et le Gruyère de Comté, bien que tous deux à maturation lactique dominante, se distinguent par la complexité de leurs matières azotées solubles. Les composés de faible poids moléculaire, oligopeptides et acides aminés, sont en effet singulièrement plus abondants dans le Gruyère de Comté, où ils forment 50 à 58 p. 100 de l'azote soluble, que dans le Saint-Paulin, où ils ne représentent que 16 à 28 p. 100. Une telle différence, qui résulte des activités respectives des protéinases et des peptidases microbiennes, ne peut vraisemblablement s'expliquer par la seule durée de l'affinage. L'intervention dans la maturation du Gruyère de Comté des lactobacilles, dont on connaît l'activité protéolytique, peut contribuer à expliquer cette différence. D'autre part, les levures, présentes dans certains fromages de Saint-Paulin, sont aptes à libérer une quantité notable d'azote soluble sous la forme de composés de poids moléculaire élevé (VEISSEYRE, LENOIR et MARCERON) ; elles peuvent donc intervenir aussi dans le phénomène.

Ces observations n'intéressent qu'un aspect de la protéolyse qui se produit au cours de la maturation. Une étude de la distribution de l'azote des fromages ne peut ignorer ni les acides aminés libres, ni les produits de décarboxylation et de désamination des acides aminés. En outre, pour interpréter une telle étude, il faut aussi connaître, de façon précise, la flore microbienne du type du fromage et son comportement spécifique vis à vis des matières azotées.

Reçu pour publication en décembre 1962

SUMMARY

NOTE ON THE COMPOSITION OF NITROGEN CONSTITUENTS IN RIPE CAMEMBERT, SAINT-PAULIN AND GRUYÈRE DE COMTÉ CHEESES

The amounts of the different forms of soluble nitrogen, total soluble nitrogen, non-protein nitrogen, nitrogen soluble in phosphotungstic acid, amino nitrogen and ammoniacal nitrogen were determined in 10 samples of each of the cheeses : Camembert, Saint-Paulin and Gruyère de Comté.

While the nitrogen constituents in each particular cheese variety showed a certain constancy, there were significant differences between varieties. Thus, total soluble nitrogen amounted to 31-34 p. 100 of total nitrogen in Camembert, 16-21 p. 100 in Saint-Paulin and 28-32 p. 100 in Gruyère de Comté. The composition of this soluble nitrogen differed appreciably from one variety of cheese to another. Amino nitrogen and ammoniacal nitrogen in Camembert amounted to 9-12 p. 100 and 21-27 p. 100 respectively, while the comparable figures for Saint-Paulin were 13-18.5 p. 100 and 2.7-8.5 p. 100 and for Gruyère de Comté 32-37 p. 100 and 10.5-14.5 p. 100 (figures shown as percentages of total soluble nitrogen).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOSWORTH A. W., 1907. D'après HAMMER B. W., 1948, *Dairy Bacteriology*, 550, Wiley and Sons, New York.
JACQUET J., LENOIR J., 1954. Sur l'affinage des fromages à pâte molle du type Camembert *C. R. Acad. Sci.*, **238**, 2201-2203.
KNUDSEN S., OVERBY A. J., 1942. *Kong. Vet. og Land. Aarskr.*, Copenhagen.

- LENOIR J., 1962. Sur la dégradation des protides au cours de la maturation du Camembert. *C. R. Acad. Agr.*, **48**, 160-169.
- LINET L., AMMANN L., 1904. D'après LINET L., 1907. *Le lait, la crème, le beurre, les fromages*, 280, Gauthier-Villars, Paris.
- MOGENSEN M. T. S., 1947. Appréciation du degré de protéolyse du fromage en prenant plus particulièrement en considération la formol titration (en danois). *Meddelande från statens Mejeriförsök*, n° 21.
- PIEN J., MAURICE G., 1937. Modifications dans la composition des fromages au cours de leur conservation prolongée. *Le Lait*, **17**, 1040-1046.
- RAIBAUD P., HERREN R., MOCQUOT G., KOSIKOWSKI F. V., 1959. Mise en évidence dans certains fromages de systèmes enzymatiques actifs sur la tyrosine. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 117-129.
- VEISSEYRE R., LENOIR J., MARCERON J. F. (Données non publiées).
- VEISSEYRE R., LENOIR J., PIERRE M. (Données non publiées).
-

NOTE TECHNIQUE

MÉTHODE DE CONSERVATION PAR CONGÉLATION DES BACTÉRIES THERMOPHILES

P. BIDAN et J. N. MORFAUX

Station de Technologie végétale, route de Saint-Cyr, Versailles (Seine-et-Oise)

Au cours d'une étude entreprise sur les pertes d'origine microbienne en sucrerie de betteraves, particulièrement dans le cas de la diffusion continue, il a été mis en évidence la présence d'une fermentation lactique due à des germes thermophiles.

Pour l'entretien au laboratoire des souches isolées, deux repiquages par jour sont nécessaires. Ce sont, en effet, des germes difficiles à conserver.

D'une façon générale, le pourcentage de germes survivants dépend essentiellement de la température de conservation, de l'espèce utilisée et de la nature du support ou du milieu de culture.

En recherchant un procédé de conservation de longue durée, nous avons été amenés à expérimenter et à adapter la méthode décrite par QUADLING (1960) pour *Xanthomonas phaseoli* et appliquée au cas de la conservation de *Leuconostoc mesenteroides* par LESLEY (1961).

Suivant cette méthode, les bactéries sont congelées dans un milieu contenant du glycérol, ce qui permet de réduire la mortalité due à la réfrigération.

Les bactéries étudiées sont gram +, non sporulées, productrices d'acide lactique, homofermentatives ; elles appartiennent au genre *Lactobacillus* ; elles ont une température optimum de croissance de 55°C dans le milieu utilisé au laboratoire. Cependant, dans le milieu industriel constitué par du jus de diffusion de betteraves non stérilisé, elles sont actives jusqu'à environ 68°C.

Les bactéries sont repiquées dans le milieu suivant : lait écrémé dilué quatre fois, digéré à la papaïne, enrichi en jus de tomate (100 g/l), en extrait de levure Difco (0,1 g/l) et en saccharose (5 g/l).

Après 15 h à l'étuve à 55°C la culture se trouve en phase stationnaire (voir figure 1) ; on peut d'ailleurs observer une légère sédimentation.

Les bactéries contenues dans 50 ml de milieu, soit environ 50 mg de bactéries, sont récoltées après 15 heures par centrifugation à basse température (10 000 t/mn, 15 minutes, température = + 4°C). Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 4 ml de tampon phosphate (0,05 M, pH = 6,0) contenant 15 p. 100 de

glycérol (volume à volume) et préalablement stérilisé à l'autoclave (120°C , 20 minutes). La totalité de la suspension est alors versée dans un flacon ; celui-ci est bouché hermétiquement et immédiatement refroidi à -20°C dans un congélateur.

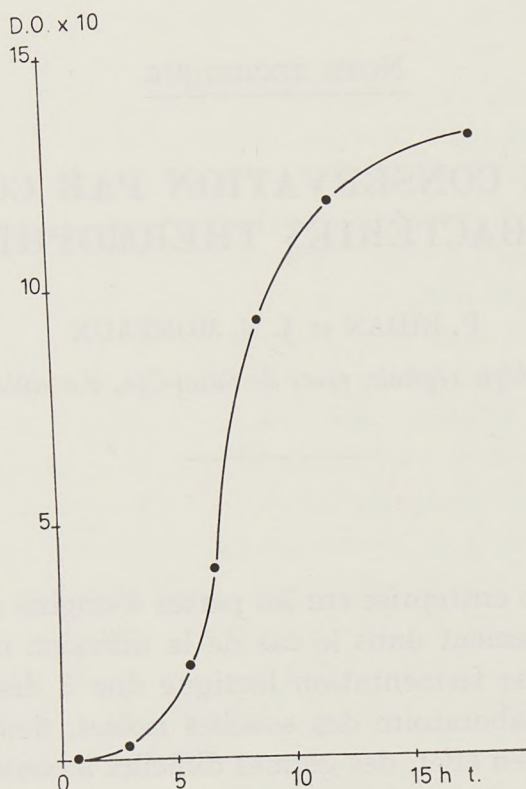


FIG. 1.

Les bactéries peuvent se conserver à cette température pendant plusieurs mois.

Il suffit, pour restaurer l'activité des cellules, de laisser la suspension bactérienne à la sortie du congélateur 30 minutes à la température ambiante.

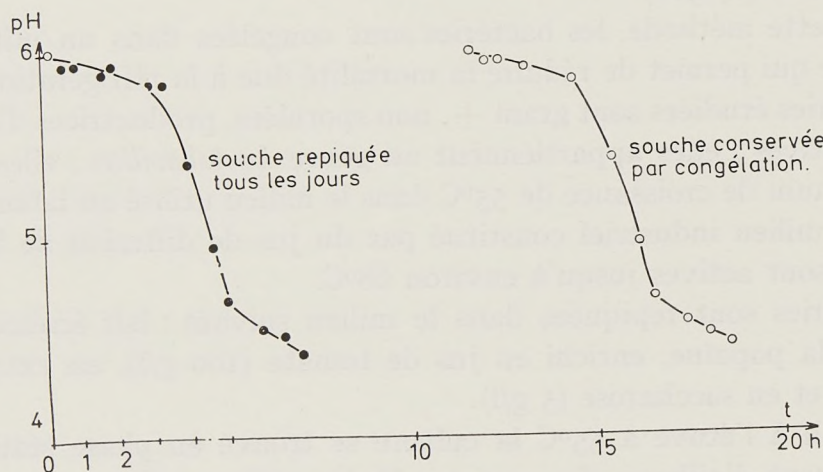


FIG. 2.

Après repiquage (0,1 ml dans 10 ml) sur milieu « lait digéré à la papaine, saccharosé » décrit précédemment et incubation à l'étuve à 55°C , la faculté de reproduction et l'activité fermentaire sont totalement restaurées. On a tracé (figure 2) les courbes

de variation du pH du milieu de culture en fonction du temps. La souche conservée par congélation pendant 6 mois est comparée à la souche repiquée tous les jours. Les courbes sont identiques, mais on remarque simplement un temps de latence plus élevé, environ 13 heures, pour la souche conservée 6 mois.

Les principaux avantages de ce procédé appliqué à la conservation de longue durée des germes thermophiles résident en une économie appréciable de temps et de milieu de culture.

Reçu pour publication en octobre 1962.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- LESLEY S. M., 1961. A method for the preservation of *Leuconostoc mesenteroides*. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1654.
- QUADLING C., 1960. Preservation of *Xanthomonas* by freezing in glycerol broth. *Canad. J. Microbiol.*, **6**, 475.
-

The purpose of this experiment was to determine the effect of temperature on the rate of reaction of hydrogen peroxide with ferrous sulfate. The reaction was carried out in a beaker, and the rate was measured by the volume of oxygen gas evolved. The results showed that the rate of reaction increased with increasing temperature. This is in agreement with the general principle that the rate of a chemical reaction increases with increasing temperature. The activation energy of the reaction was calculated to be 50 kJ/mol.

Rate of reaction vs. temperature

RESULTS AND DISCUSSION

The rate of reaction was measured at five different temperatures: 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, and 50°C. The results are shown in the following table:



The results of the experiment show that the rate of reaction increases with increasing temperature. This is in agreement with the general principle that the rate of a chemical reaction increases with increasing temperature. The activation energy of the reaction was calculated to be 50 kJ/mol.



The results of the experiment show that the rate of reaction increases with increasing temperature. This is in agreement with the general principle that the rate of a chemical reaction increases with increasing temperature. The activation energy of the reaction was calculated to be 50 kJ/mol.

AVIS

CENTENAIRE DES ÉTUDES DE PASTEUR SUR LE VIN SYMPOSIUM INTERNATIONAL D'ŒNOLOGIE

BORDEAUX, 10-15 JUIN 1963

La Station agronomique et œnologique de Bordeaux a prévu l'organisation d'un Symposium international d'Œnologie en juin 1963, qui commémorera le Centenaire des Études de PASTEUR sur le vin, et il a été décidé que le Colloque annuel de l'Institut technique du Vin coïnciderait avec ce Symposium.

Le thème en sera : « Procédés nouveaux de conservation des vins : théorie, pratique, réglementation ». Les différentes questions relatives à ce thème seront exposées par des spécialistes des différents pays, dont chacun apportera une mise au point aussi précise et aussi à jour que possible d'un sujet ayant déjà fait de sa part l'objet d'études approfondies. Il n'est pas prévu de communications libres, mais les sujets traités pourront faire l'objet d'interventions, préparées à l'avance, et de discussions en cours de séance. Les comptes rendus seront publiés.

Les demandes de renseignements et les inscriptions sont à adresser à : M. le Président du Comité d'Organisation du Symposium international d'Œnologie, Faculté des Sciences, 351, cours de la Libération, Talence (Gironde).

Président d'honneur du Symposium :

M. G. DALMASSO, doyen honoraire de la Faculté agronomique, Université de Turin (Italie).

Président du Symposium :

M. J. RIBÉREAU-GAYON, professeur à la Faculté des Sciences, Université de Bordeaux (France)

Présidents des séances :

M. M. A. AMERINE, professeur à l'Université de Californie, Département de Viticulture et d'Œnologie, Davis, Californie (U. S. A.)

M. V. BOLCATO, professeur à l'Université de Bari, directeur de l'Institut Agronomique méditerranéen (Italie)

M. L. CINCINNATO DA COSTA, professeur à l'Institut supérieur d'agronomie, Université technique de Lisbonne (Portugal)

M. E. FEDUCHY, professeur à l'Institut national de Recherches agronomiques, Madrid (Espagne)

M. M. FLANZY, directeur de la Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Institut national de la Recherche agronomique, Narbonne (France)

M. P. G. GAROGLIO, professeur à l'Université de Florence, directeur de l'Institut des Industries agricoles (Italie)

M. A. F. LINDNER, directeur de la Station de Recherches chimiques, Munich (Allemagne)

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 10-6-1963.

Dépôt légal : 3^e trimestre 1963. N° d'impression : 727.

FERMENTATION DES JUS DE RAISINS FRAIS ET DÉSULFITÉS. INFLUENCE D'ADDITIONS DE LEVURES ET DE THIAMINE

M. FLANZY et Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Les travaux relatés dans ce mémoire constituent une contribution au problème de la fermentation des jus sulfités-désulfités.

On compare la fermentation alcoolique du jus de raisin frais à celle du même jus sulfité, puis désulfité quelques mois après.

Dans une première partie, on examine ces deux types de jus, sans addition d'aucune sorte.

Dans une seconde partie, on étudie l'influence d'additions de levures et de thiamine sur la vitesse de fermentation de ces jus.

Les vins sont ensuite comparés gustativement.

INTRODUCTION

En 1943, NÈGRE et FRANÇOT ont fait des essais de fermentation de jus de raisins sulfités ; suivant le degré de désulfitation qu'ils pratiquaient, la durée de la fermentation était plus ou moins longue.

Les jus désulfités se différencient des jus frais :

— Ils ont abandonné un volume important de bourbes pendant le stockage en présence d'anhydride sulfureux, or les bourbes peuvent renfermer des activateurs de la fermentation alcoolique, ou simplement des substances utiles au déroulement normal de la fermentation ;

— ils sont dépourvus de levures ou presque ;

— ils ont subi un certain chauffage au cours de la désulfitation ;

— ils ne renferment plus de thiamine transformable en thiochrome.

Le rôle de la thiamine dans la fermentation est bien connu, elle intervient dans la composition de la carboxylase et permet la décarboxylation de l'acide pyruvique en éthanal.

Plusieurs études sur le clivage de la thiamine par les sulfites et sur l'influence de la thiamine sur la fermentation alcoolique ont été réalisées.

— En 1935 WILLIAMS *et al.* constatent que des solutions de thiamine abandonnées à la température du laboratoire, en présence de sulfite de sodium, pendant 36 heures, perdent la moitié de leur activité antinévrétique à $\text{pH} = 1$ et la totalité à $\text{pH} = 4$.

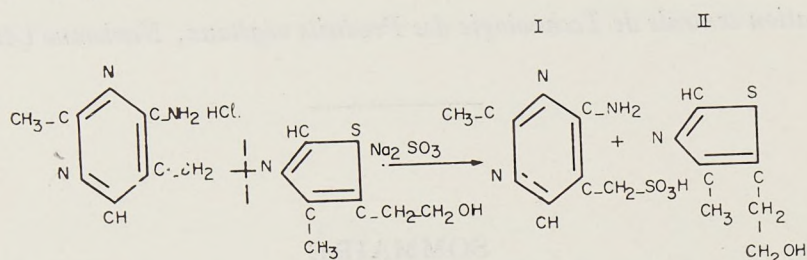
A la température du Bain de vapeur et à $\text{pH} = 5$, l'activité antinévrétique est totalement détruite en 1 heure et moins.

La concentration en sulfite de sodium était 2,6 N.

Ils démontrent qu'il y a clivage de la thiamine en deux corps qu'ils caractérisent :

I) 2 méthyl 6 aminopyrimidine 5 méthyl acide sulfonique.

II) 4 méthyl 5 (β -hydroxy) éthyl thiazole.



— En 1937, SCHULTZ, ATKIN et FREY, montrent que la vitamine B_1 exerce une action activatrice sur la fermentation alcoolique, en opérant en milieu synthétique et en utilisant des levures de boulangerie. Cette action est tellement sensible qu'ils veulent l'utiliser pour le dosage de la thiamine.

— En 1937 également, les mêmes auteurs découvrent que la levure autoclavée n'a plus de valeur vitaminique si l'on considère le test de croissance du rat, mais continue à stimuler la fermentation, il en est de même pour des solutions de thiamine chauffées à l'ébullition en milieu alcalin.

Après des essais sur les deux parties constitutives de la thiamine : 4 méthyl, 5 (β -hydroxy) éthyl thiazole et 2 méthyl 5 éthoxy méthyl 6 amino pyrimidine, les auteurs établissent que seule l'aminopyrimidine a une action sur la fermentation, le thiazole est totalement inactif.

Ceci expliquerait que la thiamine clivée par la chaleur exerce encore une action sur la fermentation.

— En 1941, SCHULTZ *et al.* remarquent qu'aucun des deux corps résultant du clivage de la thiamine par les sulfites, n'a d'action sur la fermentation alcoolique, dans les conditions qu'ils ont ainsi fixées :

— Conditions de clivage : 99 p. 100 de thiamine sont clivées en 30 minutes, au bain-Marie bouillant, à $\text{pH} 5$, en présence d'une dose de sulfite de 10 à 20 g par litre ;

— conditions de fermentation : pH voisin de la neutralité ; température : 30°C , agents de fermentation : levures de boulangerie.

Nous voyons que les conditions dans lesquelles :

1^o) la thiamine est clivée par les sulfites en faisant perdre à son constituant actif, son activité sur la fermentation,

2^o) le test de contrôle de cette perte d'activité est effectué, sont différentes de celles réalisées :

1°) au cours du mutage du jus de raisin ($\text{pH} = 3$; 700 mg de SO_2 par litre ; température du laboratoire) et

2°) au cours de la fermentation des jus ($\text{pH} = 3$; température 25° ; agents de fermentation : levures de vin *Saccharomyces ellipsoideus*).

— D'autre part, M^{lle} LAFOURCADE (1954) dans une étude sur les besoins en facteurs de croissance des levures du Médoc et de St-Émilion, détermine l'influence de chaque facteur sur la croissance et aussi sur le pouvoir fermentaire de ces levures.

Voici les résultats obtenus pour les *Saccharomyces ellipsoideus* : elles sont parfaitement capables de se multiplier dans un milieu absolument privé de vitamines, elles sont auxoautotrophes. Cependant, elles sont plus ou moins affectées dans leur fermentation par l'absence d'acide pantothénique surtout, et de thiamine à un degré moindre.

— RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, en 1952, montrent que dans le jus de raisin frais, des additions de vitamine B_1 , de biotine ou de mesoinositol provoquent toujours une accélération très nette de la fermentation. C'est la vitamine B_1 qui a l'action la plus forte, lorsque l'on emploie des levures elliptiques, sur la vitesse de fermentation ainsi que sur la multiplication des levures.

Ils pensent qu'il n'y a jamais assez de vitamine B_1 dans le moût de raisin frais pour donner à la fermentation sa vitesse maximum.

D'autres auteurs ont étudié l'influence de la thiamine pure, sur la fermentation du jus de raisin frais.

Les avis sont controversés, CASAS LUCAS (1954), trouve comme RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (1952 et 1953), qu'elle a une action favorable.

Pour d'autres, le jus de raisin est naturellement assez riche en cette vitamine, DUPUY et FLANZY (1954), DUPUY, NORTZ et PUISAIS (1955).

Enfin, pour d'autres encore, la thiamine possède une action activatrice à certaines doses, et une action retardatrice à des doses supérieures, GARINO-CANINA et TREVISIOL (1954), KNUCHEL, DESHUSSES et CORBAZ (1954).

Il peut donc paraître intéressant de compléter ces travaux par :

— une étude sur l'action de la thiamine traitée par le SO_2 selon les conditions d'élaboration des mutés ;

— une étude sur l'influence d'additions de thiamine pure sur la fermentation des jus sulfités-désulfités ;

d'autant plus que durant ces quinze dernières années, des progrès ont été réalisés dans les techniques de désulfitation.

Il est maintenant possible de désulfiter des mutés dans de bonnes conditions : sans concentration, sans chauffage prolongé à une température trop élevée et surtout sans contact avec l'air.

PROTOCOLE DES ESSAIS

Des essais ont été réalisés en 1961 et 1962 sur les jus de différentes variétés de raisins rouges et blancs.

Trois sortes de jus ont été expérimentés :

- 1°) le jus frais,
- 2°) le jus frais ayant subi l'opération de désulfitation immédiatement après son élaboration,
- 3°) le jus sulfité à la vendange par addition de métabisulfite de potassium et désulfité au moment de sa mise en fermentation.

Les conditions de désulfitation des jus au moyen de l'appareil I. N. R. A. (1959) sont les suivantes : le jus est chauffé sous vide et sous réfrigérant à reflux. La température ne s'élève pas au-dessus de 87°C, la durée du chauffage ne dépasse pas 4 minutes.

La teneur en SO_2 total des jus à la sortie du désulfiteur reste inférieure à 50 mg par litre, elle est en général de l'ordre de 20 à 30 mg/litre.

Voici les essais réalisés avec :

1°) Les trois sortes de jus : frais, chauffés, désulfités.

- Jus naturel.
- Jus ensemencé à 2 millions de levures par ml.
- Jus additionné de 500 γ ou 1 000 γ de thiamine par litre.
- Jus additionné de 500 γ ou 1 000 γ de thiamine par litre et ensemencé à 2 millions de levures par ml.

2°) Les jus désulfités seulement :

- Jus naturel avec et sans levures (2 millions par ml).
- Jus avec le poids de bourbes correspondant.
- Jus avec le double de ce poids de bourbes.
- Jus avec bourbes et ensemencé à 2 millions par ml.

Les fermentations se sont poursuivies en atmosphère de CO_2 selon la technique de microvinification FLANZY et POUX (1958), dans des flacons de 2 litres de capacité renfermant 1,5 litre de jus.

Le bouchon de chaque flacon était muni de deux tubes, l'un relié à une rampe où circulait du CO_2 , l'autre relié à une rampe d'évacuation.

La température a été maintenue entre 25 et 26°C.

L'ensemencement a été pratiqué à partir d'un levain constitué par du jus de raisin stérilisé, ensemencé au moyen de levures (*Saccharomyces ellipsoideus*), isolées à partir de raisins frais et cultivées sur gélose, faisant partie de la collection de la Station, inventoriées sous le N° L 9.

Lorsque ce levain était en pleine activité, on effectuait un comptage des cellules au compteglobule de MALASSEZ et on centrifugeait le volume nécessaire. Les levures ainsi séparées étaient introduites dans les jus d'essais.

Les jus sulfités ont été désulfités et mis en fermentation au mois de mai en 1961 et au mois de janvier en 1962. Ils sont donc restés sulfités 8 mois pour 1961 et 4 mois pour 1962.

Les bourbes des jus sulfités ont été centrifugées, une partie était ajoutée à l'état sulfité, une autre était préalablement désulfitée à la vapeur d'eau.

L'évolution de la fermentation a été suivie par pesées du gaz carbonique dégagé ; les pesées étaient effectuées tous les jours à la même heure.

Du poids de gaz carbonique perdu on peut calculer approximativement le poids de sucre fermenté.

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en perte de poids, en grammes pour 1 000 g de jus.

On a établi pour chaque essai deux sortes de courbes : courbes de fermentation et courbes de vitesse, qui ont les caractéristiques suivantes :

1°) *Courbes de fermentation.*

On porte la perte totale de poids en ordonnée et le temps en abscisse, elles représentent l'allure de la fermentation.

On distingue 3 parties que l'on peut représenter théoriquement selon la figure 1.

— Phase d'induction, la pente p_1 de cette portion de courbe est faible, on a une période de latence, d'adaptation, de production de levures.

— Phase de fermentation tumultueuse. La pente p_2 de la courbe augmente rapidement, la fermentation se poursuit activement.

— Phase de fermentation terminale, la courbe s'apparente à une droite de très faible pente p_3 .

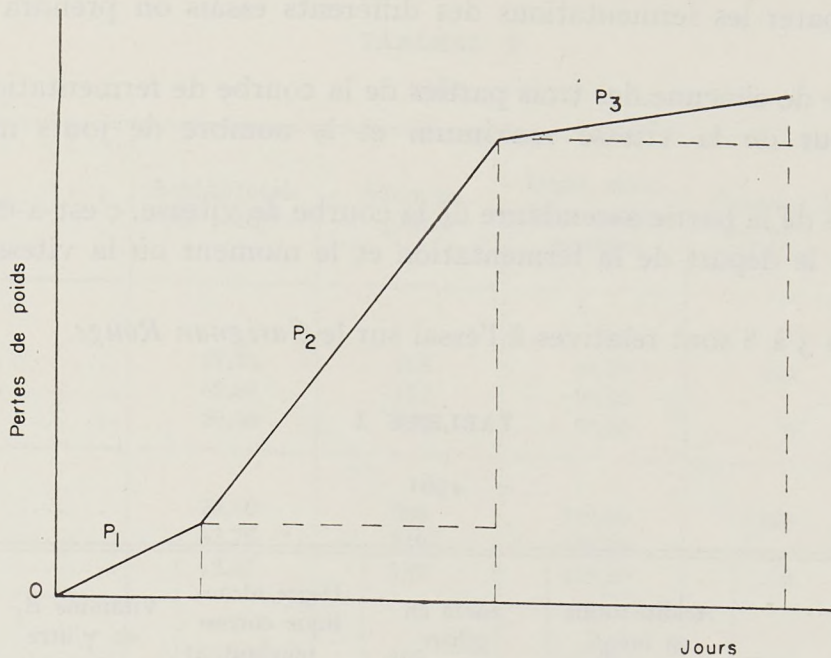


FIG. 1

2^o) Courbes de vitesse.

On porte la perte de poids journalière en ordonnée et le temps en abscisse. Elles ont l'allure de la figure 2.

Elles comportent deux parties principales : une partie ascendante et une descendante, les deux parties n'étant pas symétriques.

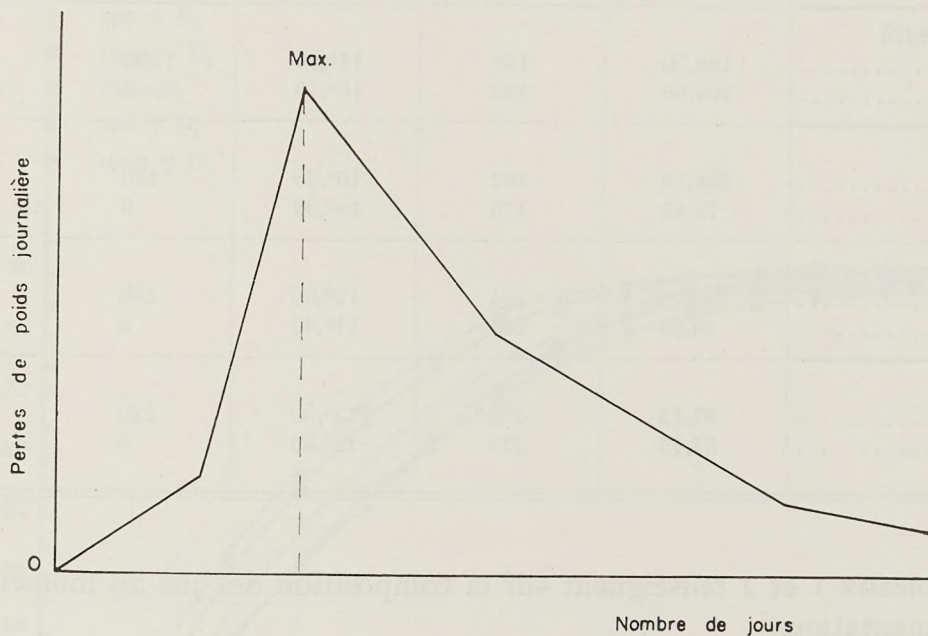


FIG. 2

La vitesse de fermentation augmente très rapidement, passe par un maximum, et diminue rapidement d'abord puis plus lentement.

La partie ascendante peut comporter au départ une phase de latence.

La partie descendante se divise en deux portions, l'une très descendante, l'autre beaucoup moins.

Pour comparer les fermentations des différents essais on prendra comme critères :

- la pente de chacune des trois parties de la courbe de fermentation ;
- la valeur de la vitesse maximum et le nombre de jours mis pour l'atteindre ;
- la pente de la partie ascendante de la courbe de vitesse, c'est-à-dire la vitesse moyenne entre le départ de la fermentation et le moment où la vitesse maximum est atteinte.

Les figures 3 à 8 sont relatives à l'essai sur le *Carignan Rouge*.

TABLEAU I

1961

Cépages	Acidité totale en méq/l	Sucre en g/litre	Degré alcoo- lique corres- pondant	Vitamine B ₁ en γ/litre	SO ₂ total en mg/litre
<i>Clairette</i>					
Frais	97,95	170	10°,00	240	0
Désulfité.....	44,90	167	9°,80	0	25
<i>Listan</i>					
Frais	69,38	149	8°,80	170	0
Désulfité.....	26,53	142	8°,40	0	30
<i>Hybride blanc 12375</i>					
Frais	138,70	188	11°,00	200	0
Désulfité.....	104,00	182	10°,70	0	30
<i>Aramon</i>					
Frais	108,16	182	10°,70	180	0
Désulfité.....	73,45	175	10°,30	0	35
<i>Carignan rouge</i>					
Frais	102,00	204	12°,00	260	0
Désulfité.....	59,20	200	11°,80	0	35
<i>Valdiguié</i>					
Frais	87,75	225	13°,30	220	0
Désulfité.....	57,15	218	12°,80	0	30

Les tableaux 1 et 2 renseignent sur la composition des jus au moment de leur mise en fermentation.

Les jus désulfités sont beaucoup moins acides que les jus frais correspondant, une perte importante d'acidité s'est produite pendant la conservation sous forme de mutés.

Les jus ont été sulfités par addition de métabisulfite de potassium ; c'est la présence du potassium qui doit être à l'origine, tout au moins en partie, de cette baisse d'acidité en provoquant une précipitation d'acide tartrique sous forme de bitartrate de potassium.

TABLEAU 2

1962

Cépages	Acidité totale en méq/l	Sucre en g/litre	Degré alcoo- lique corres- pondant	Vitamine B ₁ en γ/l	SO ₂ Total en mg/litre
<i>Listan</i>					
Frais	67,34	148	8°,70	150	0
Chauffé	69,38	152	9°,50		
Désulfité.....	20,40	121	7°,10	0	30
<i>Carignan rouge</i>					
Frais	79,60	200	11°,80	240	0
Chauffé	87,75	210	12°,30		
Désulfité.....	42,85	189	11°,10	0	40
<i>Morastel</i>					
Frais	165,30	140	8°,20	250	0
Chauffé	167,34	142	8°,40		
Désulfité.....	116,32	130	7°,60	0	40
<i>Alicante</i>					
Frais	171,42	147	8°,60	300	
Chauffé	173,46	149	8°,80		

- Sans levures ● Témoin
 ○ 500 γ B₁
 ■ 1000 γ B₁
- Avec levures □ Témoin
 ▣ 500 γ B₁
 ◆ 1000 γ B₁

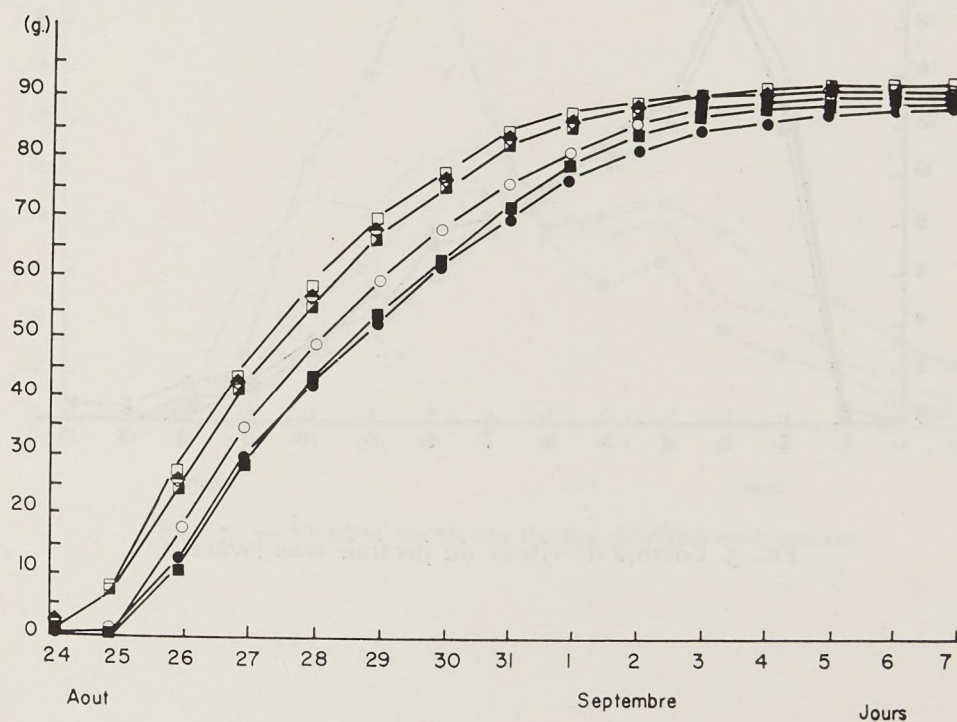


FIG. 3. Courbes de fermentation du jus frais

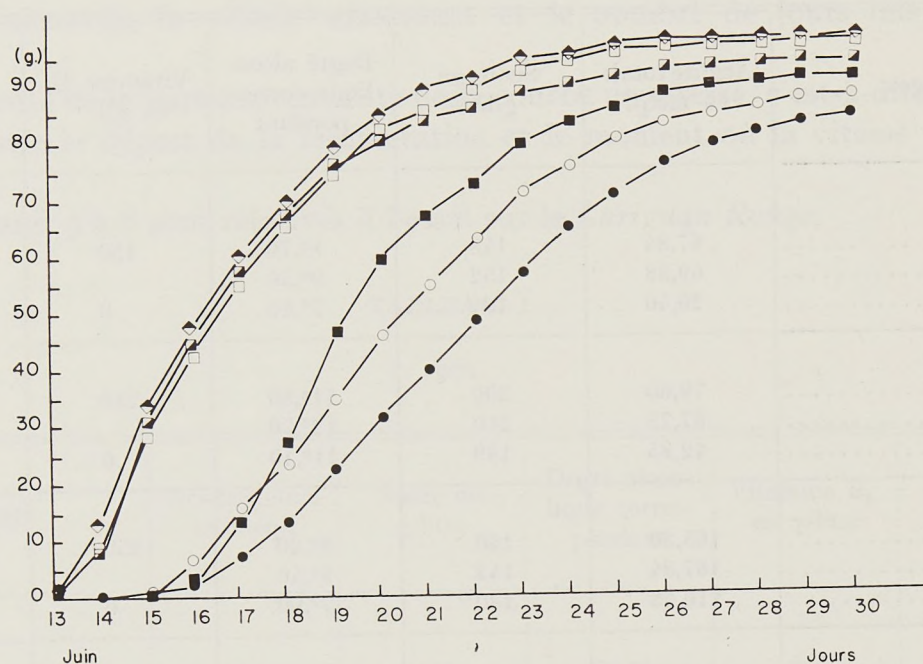


FIG. 4. Courbes de fermentation du jus désulfité

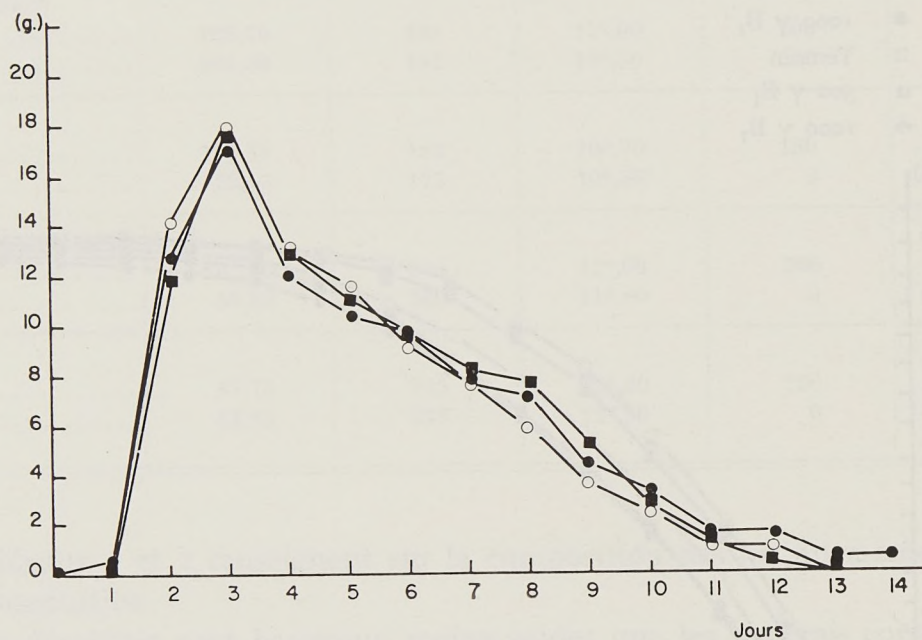


FIG. 5. Courbes de vitesse du jus frais sans levures

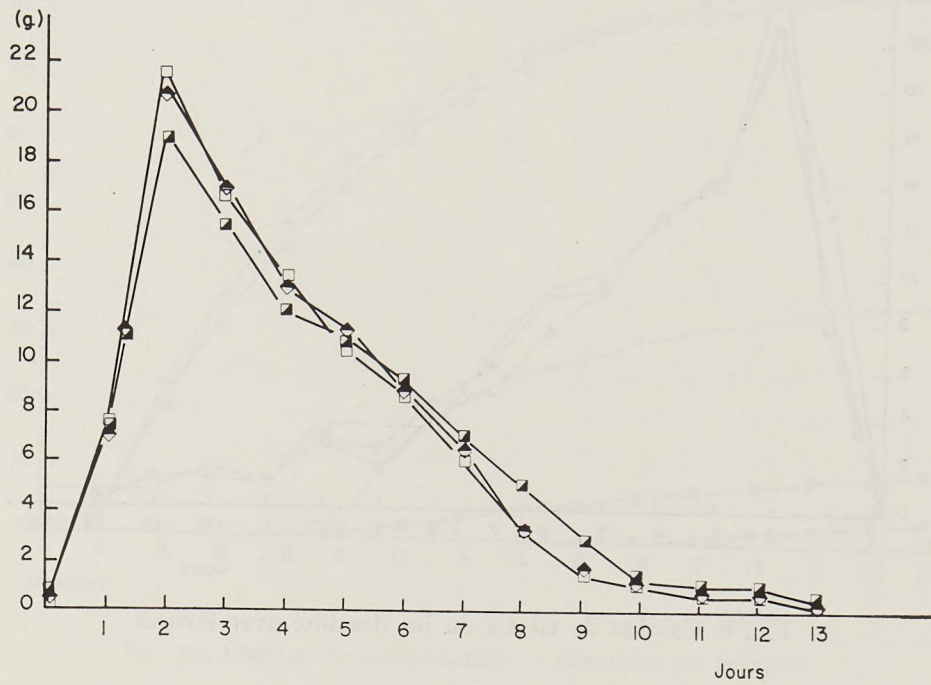


FIG. 6. Courbes de vitesse du jus frais avec levures

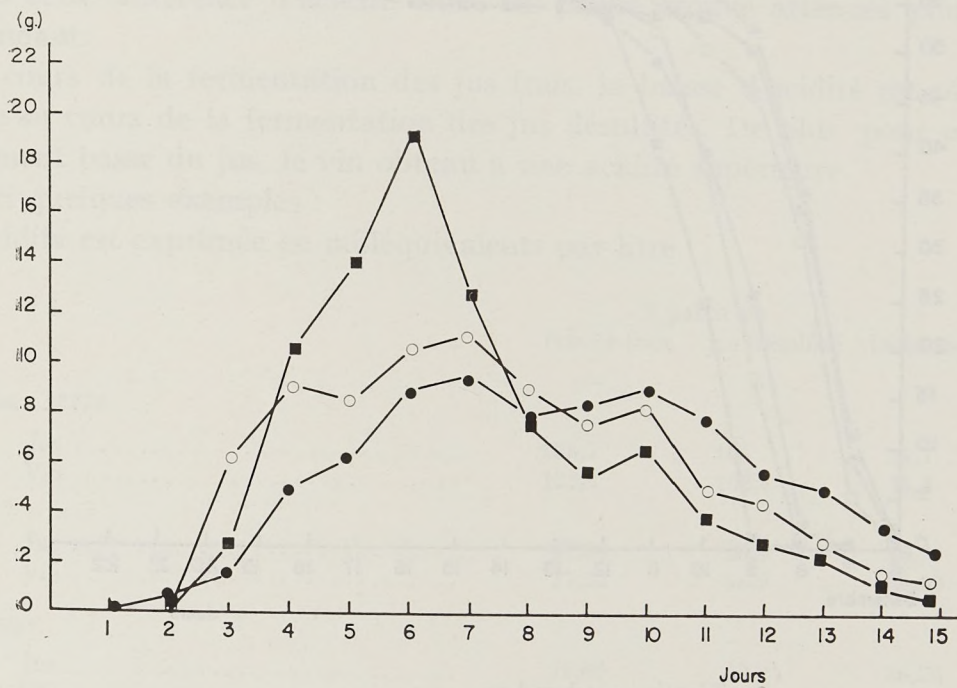


FIG. 7. — Courbes de vitesse du jus désulfité sans levures

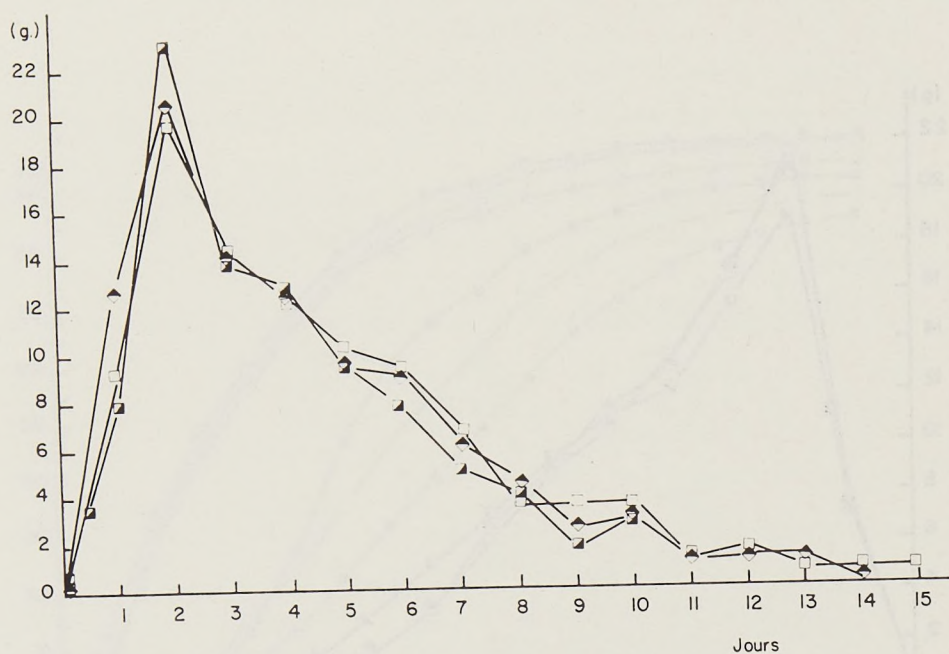
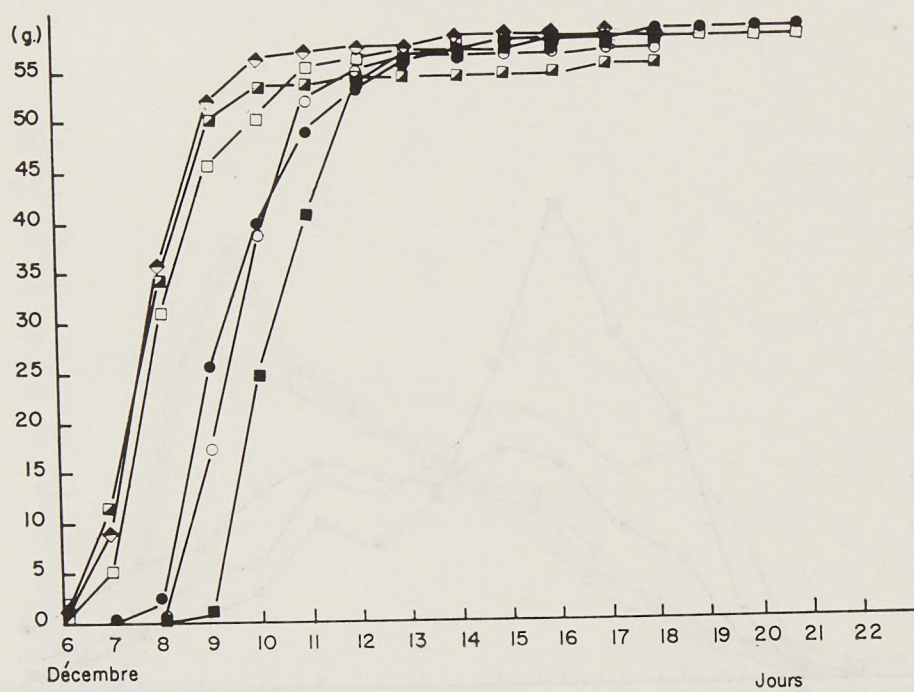


FIG. 8. Courbes de vitesse du jus désulfité avec levures



- Témoin sans bourbes
- 29 g bourbes désulfitées p. 1 000
- 29 g bourbes sulfitées p. 1 000
- Témoin sans bourbes avec levures
- ◻ 29 g bourbes désulfitées p. 1 000 avec levures
- ◆ 29 g bourbes sulfitées p. 1 000 avec levures

FIG. 9. — Courbes de fermentation : jus *Listan* désulfité avec additions de bourbes

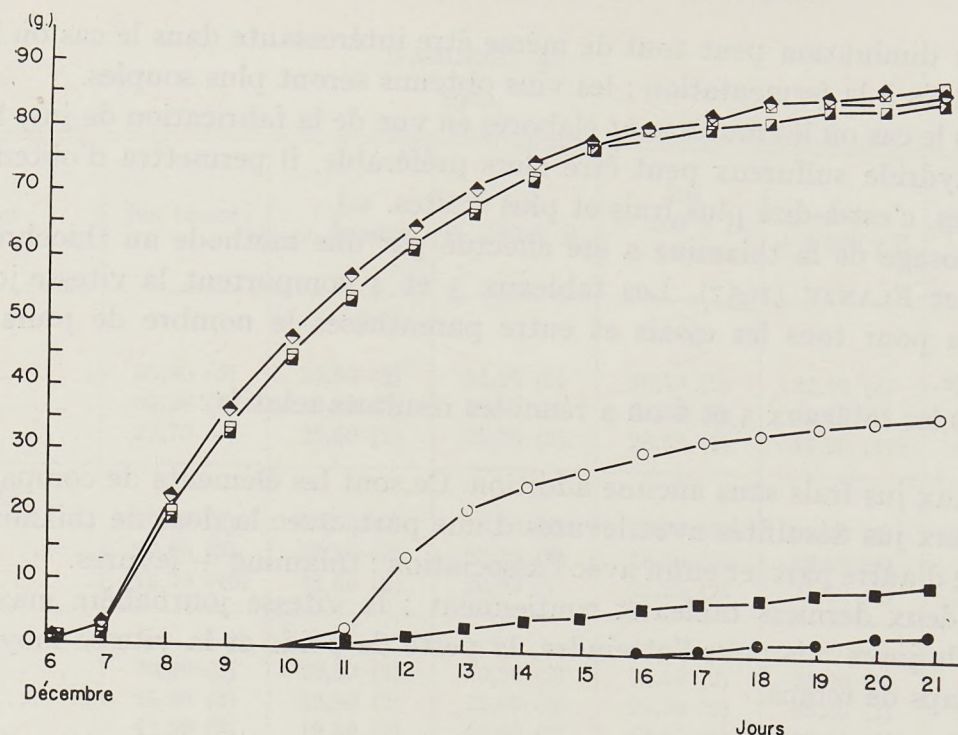


FIG. 10. Courbes de fermentation — Grenache jus désulfité

Théoriquement, la dose de métabisulfite ajoutée, 2 g par litre de jus, peut faire perdre environ 35 méq acides par litre, or les moûts ont perdu dans nos essais de 30 à 50 méq d'acidité.

Mais cette différence d'acidité entre les jus se trouve atténuée pour les vins correspondant.

Au cours de la fermentation des jus frais, la baisse d'acidité est plus importante qu'au cours de la fermentation des jus désulfités. De plus, pour une acidité suffisamment basse du jus, le vin obtenu a une acidité supérieure.

Voici quelques exemples :

L'acidité est exprimée en milléquivalents par litre.

		A partir de		Différence
		raisins frais	jus désulfité	
<i>Hybride blanc 12375</i>		—	—	—
	Jus	138,7	104	34,7
	Vin	122,4	108,1	14,3
<i>Listan</i>				
	Jus	67,34	20,4	46,94
	Vin	77,52	46,9	30,62
<i>Carignan rouge</i>				
	Jus	79,60	42,84	36,76
	Vin	71,40	67,32	40,80
<i>Morastel</i>				
	Jus	165,30	116,30	49,00
	Vin	140,76	112,20	28,56

La sulfitation au moyen d'anhydride sulfureux en solution concentrée, réduirait certainement cette diminution de l'acidité.

Cette diminution peut tout de même être intéressante dans le cas où les mutés sont destinés à la fermentation ; les vins obtenus seront plus souples.

Dans le cas où les mutés sont élaborés en vue de la fabrication de jus, le mutage par l'anhydride sulfureux peut être alors préférable, il permettra d'obtenir des jus plus acides, c'est-à-dire plus frais et plus fruités.

Le dosage de la thiamine a été effectué par une méthode au thiochrome selon OURNAC et FLANZY (1957). Les tableaux 3 et 4 comportent la vitesse journalière maximum pour tous les essais et entre parenthèses le nombre de jours mis pour l'atteindre.

Dans les tableaux 5 et 6 on a réuni les résultats relatifs :

1^o) aux jus frais sans aucune addition. Ce sont les éléments de comparaison :

2^o) aux jus désulfités avec levures d'une part, avec la dose de thiamine la plus favorable d'autre part, et enfin avec l'association : thiamine + levures.

Ces deux derniers tableaux contiennent : la vitesse journalière maximum, le nombre de jours mis pour l'atteindre, la perte de poids et la vitesse moyenne pendant ce laps de temps.

TABLEAU 3

1961

Cépages	Jus témoin	Jus + levures	Jus + 500 γ B ₁	Jus + 500 γ B ₁ + levures	Jus + 1 000 γ B ₁	Jus + 1 000 γ B ₁ + levures
<i>Clairette</i>						
Frais	20,00 (2)	26,50 (2)	22,00 (2)	26,00 (2)	22,00 (2)	24,30 (2)
Désulfité.....	14,80 (3)	19,30 (2)	14,20 (7)	24,40 (2)	21,70 (5)	24,50 (2)
<i>Listan</i>						
Frais	19,50 (2)	23,90 (2)	19,50 (2)	24,40 (2)	21,00 (2)	23,90 (2)
Désulfité.....	17,50 (4)	24,50 (2)	22,30 (3)	37,00 (2)	21,00 (3)	28,50 (2)
<i>Hybride blanc 12375</i>						
Frais	27,00 (2)	32,00 (2)	26,80 (2)	29,60 (2)	26,90 (2)	29,60 (2)
Désulfité.....	8,80 (8)	19,10 (2)	15,30 (6)	21,80 (2)	9,30 (10)	24,50 (2)
<i>Aramon</i>						
Frais	32,00 (2)	30,00 (2)	32,50 (2)	30,70 (2)	32,50 (2)	31,30 (2)
Désulfité.....	6,00 (3)	15,40 (3)	7,70 (4)	29,00 (1)	13,00 (4)	33,30 (1)
<i>Carignan rouge</i>						
Frais	17,40 (3)	21,70 (2)	19,00 (2)	17,40 (2)	17,90 (3)	21,00 (2)
Désulfité.....	9,70 (7)	20,00 (2)	11,20 (7)	23,60 (2)	19,50 (6)	20,70 (2)
<i>Valdiguié</i>						
Frais	21,20 (3)	30,40 (2)	22,70 (3)	31,40 (2)	21,70 (3)	29,80 (2)
Désulfité.....	13,40 (8)	22,70 (2)	15,00 (4)	38,80 (2)	13,90 (8)	39,70 (2)

Vitesse journalière maximum (perte de poids journalière, maximum, en g pour 1 000 g de jus).
Entre parenthèses, nombre de jours mis pour atteindre cette vitesse maximum.

TABLEAU 4

1962

Cépages	Jus témoin	Jus + levures	Jus + 500 γ B ₁	Jus + 500 γ B ₁ + levures	Jus + 1 000 γ B ₁	Jus + 1 000 γ B ₁ + levures
<i>Listan</i>						
Frais	34,80 (3)	35,00 (2)	31,20 (3)	36,40 (2)	32,40 (3)	35,20 (2)
Chauffé	35,20 (3)	33,20 (2)	32,60 (3)	35,50 (2)	32,60 (3)	35,10 (2)
Désulfité.....	23,70 (3)	25,60 (2)	25,70 (3)	26,60 (2)	16,20 (11)	28,30 (2)
<i>Carignan rouge</i>						
Frais	22,80 (2)	22,50 (2)	23,50 (2)	23,90 (2)	23,00 (2)	25,00 (2)
Chauffé	27,40 (3)	26,80 (2)	23,20 (3)	28,50 (2)	29,40 (3)	27,80 (2)
Désulfité.....	16,00 (10)	21,60 (2)	20,90 (4)	25,20 (2)	25,40 (3)	25,20 (2)
<i>Morastel</i>						
Frais	20,30 (2)	20,90 (2)	20,90 (2)	21,40 (2)	21,30 (2)	21,40 (2)
Chauffé	25,90 (2)	23,90 (2)	25,80 (2)	24,70 (2)	23,30 (2)	25,00 (2)
Désulfité.....	12,50 (3)	18,50 (2)	16,80 (3)	18,60 (2)	10,00 (11)	19,30 (2)
<i>Alicante</i>						
Frais	21,00 (2)	23,80 (2)	25,20 (3)	27,70 (2)	27,80 (2)	24,50 (2)
Chauffé	21,90 (3)	28,60 (2)	25,20 (2)	30,20 (2)	21,40 (3)	30,20 (2)

Vitesse journalière maximum (perte de poids journalière, maximum, en g pour 1 000 g de jus).
Entre parenthèses, nombre de jours mis pour atteindre cette vitesse maximum.

TABLEAU 5

1961

Cépages	Vitesse maximum	Nombre de jours pour l'atteindre	Perte totale jusqu'au maximum	Vitesse moyenne jusqu'au maximum
<i>Clairette</i>				
Jus frais	20,00	2	21,00	10,50
Jus désulfité + levures	19,30	2	24,40	12,20
Jus désulfité + B ₁ (1 000 γ)	21,70	5	26,30	5,30
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	24,50	2	30,00	15,00
<i>Listan</i>				
Jus frais	19,50	2	20,00	10,00
Jus désulfité + levures	24,50	2	30,80	15,40
Jus désulfité + B ₁ (500 γ)	22,30	3	24,00	8,00
Jus désulfité + levures + B ₁ (500 γ)	37,00	2	40,50	20,20
<i>Hybride blanc 12375</i>				
Jus frais	27,00	2	28,60	14,30
Jus désulfité + levures	19,10	2	19,10	9,60
Jus désulfité + B ₁ (500 γ)	15,30	6	20,20	3,40
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	24,50	2	25,00	12,50

TABLEAU 5 (*suite*)

Cépages	Vitesse maximum	Nombre de jours pour l'atteindre	Perte totale jusqu'au maximum	Vitesse moyenne jusqu'au maximum
<i>Aramon</i>				
Jus frais.....	32,00	2	49,00	24,50
Jus désulfité + levures	15,40	3	44,50	14,80
Jus désulfité + B ₁ (1 000 γ)	13,00	4	18,50	4,60
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	33,30	1	33,30	33,30
<i>Carignan rouge</i>				
Jus frais	17,40	3	30,50	10,20
Jus désulfité + levures	20,00	2	29,00	14,50
Jus désulfité + B ₁ (1 000 γ)	19,50	6	27,30	5,40
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	23,60	2	31,50	15,80
<i>Valdigué</i>				
Jus frais	21,20	3	42,80	14,20
Jus désulfité + levures	22,75	2	22,75	11,40
Jus désulfité + B ₁ (500 γ)	15,00	4	26,20	6,00
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	39,70	2	40,20	20,10

TABLEAU 6

1962

Cépages	Vitesse maximum	Nombre de jours pour l'atteindre	Perte totale jusqu'au maximum	Vitesse moyenne jusqu'au maximum
<i>Listan</i>				
Jus frais	34,60	3	40,90	13,60
Jus désulfité + levures	25,60	2	30,80	15,40
Jus désulfité + B ₁ (500 γ)	25,70	3	32,40	10,80
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	28,30	2	35,90	18,00
<i>Carignan rouge</i>				
Jus frais	22,80	2	43,20	21,60
Jus désulfité + levures	21,60	2	28,40	14,20
Jus désulfité + B ₁ (1 000 γ)	25,40	3	25,40	8,40
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	25,20	2	33,20	16,60
<i>Morastel</i>				
Jus frais	20,30	2	37,50	18,70
Jus désulfité + levures	18,50	2	22,60	11,30
Jus désulfité + B ₁ (500 γ).....	16,80	3	17,10	5,70
Jus désulfité + levures + B ₁ (1 000 γ) ..	19,30	2	23,60	11,80
<i>Alicante</i>				
Jus frais	20,90	2	20,90	10,40
Jus frais + levures	23,84	2	45,80	22,90

RÉSULTATS

Voici les résultats observés :

JUS FRAIS

Jus nonensemencés

Pour les jus frais, les différentes portions des courbes de fermentation sont très distinctes et différenciées.

La phase d'induction est courte, elle ne dépasse pas un jour ; la phase de fermentation tumultueuse est très ascendante et la phase de fermentation terminale dure très peu.

On peut chiffrer approximativement les limites des pentes des trois portions de courbe pour bien les distinguer, ainsi :

P_1 — de 0 à 2

P_2 — de 10 à 20

P_3 — de 0 à 1

La vitesse maxima est atteinte très rapidement, en 2 jours généralement.
La durée totale de fermentation est comprise entre 6 et 10 jours.

Jusensemencés

Dans certains cas l'addition de levures au jus frais ne provoque aucune modification dans le déroulement de la fermentation.

Dans d'autres cas, les effets produits sont les suivants :

- la fermentation démarre plus vite, la phase d'induction est diminuée ;
- la pente de la phase de fermentation tumultueuse est plus grande ;
- la fermentation est accélérée, la vitesse de fermentation augmente plus vite, les vitesses maximum et moyenne sont plus élevées.

Jus additionnés de thiamine

Il faut distinguer les jus nonensemencés et les jusensemencés.

Sur les jus nonensemencés l'influence de la thiamine est très irrégulière, tantôt elle accélère la fermentation, tantôt elle la retarde, et souvent elle n'agit pas du tout.

Les teneurs initiales des jus en thiamine ne paraissent pas, dans les cas considérés, avoir d'influence.

Pour l'*Aramon*, jus d'une teneur en vitamine B_1 assez faible, les courbes des 6 essais, avec et sans thiamine, avec et sans levures, avec et sans levures + thiamine, sont confondues ; la thiamine ajoutée n'a eu aucune action sur la fermentation.

Pour le *Listan*, jus lui aussi pauvre en thiamine, en 1961, la thiamine à la dose de 1 000 γ par litre a accéléré la fermentation, mais en 1962, les doses de 500 γ et 1 000 γ par litre ont ralenti la fermentation.

Le *Carignan rouge*, jus plus riche en vitamine B₁ que les précédents, voit en 1961, sa fermentation accélérée par la thiamine ajoutée, 500 γ /litre agissant plus que 1 000 γ /litre ; et en 1962, voit sa fermentation accélérée par 500 γ /litre et retardée par 1 000 γ /litre.

Donc d'autres éléments biotiques interviennent.

L'accélération de la fermentation par la thiamine se produit généralement au cours de la phase de fermentation tumultueuse.

Les jus *ensemencés* sont beaucoup moins sensibles aux variations que peut provoquer la thiamine au cours de leur fermentation. Les courbes de fermentation et de vitesse correspondantes sont très groupées et souvent presque confondues.

JUS CHAUFFÉS

Les jus chauffés fermentent parfois plus lentement, parfois plus rapidement que les jus frais ; les différences restent cependant faibles.

Il existe dans certains cas un écart légèrement plus grand, entre les courbes de fermentation avec et sans levures, que pour les jus frais. Cette différence semble être en relation avec la diminution du nombre de levures vivantes.

JUS DÉSULFITÉS

Jus non ensemencés

Les jus désulfités non ensemencés, fermentent moins rapidement que les jus frais. La fermentation peut durer de 10 à 25 jours au lieu de 6 à 10 comme pour les jus frais.

Les courbes de fermentation sont étirées, la phase d'induction est plus étendue, elle dure de 2 à 5 jours. Il n'existe plus de démarcation nette entre les deux dernières phases : fermentation tumultueuse et fermentation terminale.

Les courbes de vitesse sont aplaties et étalées, les vitesses maximum et moyenne sont nettement plus faibles. La fermentation se poursuit cependant jusqu'à la disparition complète du sucre.

Jus ensemencés

L'ensemencement tel que nous l'avons pratiqué accélère de façon notable la fermentation.

L'écart entre les courbes de fermentation des jus désulfités non ensemencés et ensemencés est important.

Les courbes se relèvent, la phase d'induction diminue, et la pente de la phase tumultueuse s'accroît. Les courbes de vitesse se redressent et se rapprochent de l'axe des ordonnées, la vitesse maximum est accrue dans de grandes proportions ainsi que la vitesse moyenne.

Dans de nombreux cas, la marche de la fermentation du jus désulfité-ensemencé est la même que celle du jus frais ; les courbes se superposent.

Le cas du *Grenache blanc* désulfité est intéressant à commenter. Il est illustré par la figure 10. Les trois essais non ensemencés : naturel et avec 500 γ /l et 1 000 γ /l de thiamine, ont attendu très longtemps avant d'entrer en fermentation ; celle-ci une fois déclarée s'est poursuivie très lentement et n'a pu s'achever.

La thiamine a eu dans ce cas une action favorable importante : elle a permis à la fermentation de démarrer plus tôt et de se poursuivre avec une vitesse plus grande.

Par contre, les trois essais ensemencés, avec ou sans additions de thiamine, ont fermenté normalement. La thiamine n'a que très légèrement activé la fermentation vers le milieu de la deuxième phase.

C'est uniquement l'ensemencement qui a permis à ce jus, de fermentation difficile, de retrouver une allure normale de fermentation.

Ce cas particulier, confirme l'action activatrice que les levures exercent sur la fermentation des jus désulfités.

Jus additionnés de thiamine

La vitamine B₁ active la fermentation des jus désulfités dans presque tous les cas, la dose utilisée, 500 γ /l ou 1 000 γ /l étant indifférente.

L'action de la thiamine se manifeste au maximum vers le milieu de la phase de fermentation tumultueuse, la phase d'induction n'est presque pas modifiée.

Les vitesses maximum et moyenne sont accrues. L'amplitude de l'effet activateur de la thiamine est différent selon que le jus est ou non ensemencé. Les jus ensemencés sont moins sensibles à l'influence de cette vitamine que les jus naturels : on retrouve les mêmes constatations que pour les jus frais.

Les courbes relatives aux jus ensemencés-vitaminés, sont toujours groupées et resserrées.

Les levures et la thiamine agissant ensemble, activent la fermentation davantage que les levures seules, mais leur action est inférieure à la somme des deux actions séparées.

L'addition de thiamine seule ne permet que peu souvent de rétablir la fermentation du jus frais tandis que l'addition de levures seules, ou l'addition de levures + thiamine, permettent dans la majorité des cas, de donner à un jus désulfité une marche de fermentation identique à celle du jus frais.

Comparaison entre l'action de la thiamine et l'action des levures sur la fermentation des jus désulfités

Les actions favorables de la thiamine et de l'ensemencement sur la fermentation des jus désulfités sont différentes. Si on considère l'augmentation des vitesses maxima et moyenne, l'influence des levures est supérieure à celle de la thiamine.

D'après les courbes de fermentation, on constate que les levures avancent le départ de la fermentation, et provoquent une accélération à son début, alors que la thiamine ne semble pas avoir d'action sur le démarrage de la fermentation, mais seulement pendant la fermentation tumultueuse.

Addition des bourbes

Les bourbes ajoutées aux jus de raisin désulfités ont une influence irrégulière sur la fermentation, qu'elles soient sulfitées ou désulfitées ; parfois elles accélèrent la fermentation, parfois elles la retardent.

Dans les jus ensemencés, elles renforcent légèrement l'action des levures.

Ici aussi, l'influence des bourbes, dans un sens ou dans un autre, est plus faible sur les jus ensemencés que sur les jus naturels. La figure 9 représente les courbes de fermentation du jus *Listan* désulfité avec addition de bourbes.

TENEUR EN ALCOOL DES VINS OBTENUS

Les degrés alcooliques des vins finis ont été déterminés par oxydation chromique (FLANZY, BOUZIGUES et BOUZIGUES, 1955), ils ne varient pratiquement pas à l'intérieur de chaque série d'essais.

Les additions de levures ou de thiamine, telles que nous les avons pratiquées, ne paraissent avoir aucune action sur le rendement en alcool.

ASPECT ET EXAMEN ORGANOLEPTIQUE DES VINS DE MUTÉS

Les vins de mutés présentent tout d'abord une atténuation de la couleur, ils paraissent oxydés, leur couleur est usée.

A la dégustation, ils ont des caractères différents de ceux des vins de jus frais correspondant, mais sont tous très consommables.

Ils sont moins acides, moins frais, mais plus souples.

Les caractères des vins témoins, bons ou mauvais, sont moins marqués dans les vins de mutés.

Les vins de mutés sont plus faits, ils paraissent vieillis, ils sont même dans certains cas plus agréables à boire, surtout lorsqu'ils sont issus d'un moût initial très acide, c'est-à-dire provenant de raisins insuffisamment mûrs.

Un cas intéressant semble être celui de l'hybride blanc 12375 ; le vin témoin possède nettement le goût particulier des vins hybrides, alors que ce goût a disparu dans le vin issu de muté.

CONCLUSION

En comparant la fermentation des jus de raisin frais et des mêmes jus sulfités, puis désulfités, et en étudiant l'influence sur ces fermentations, d'addition de levures et de vitamines B₁, on constate ceci :

Les jus frais sont influencés de façon très irrégulière par des additions de thiamine.

L'ensemencement, selon les cas, active la fermentation dans des proportions variables.

Les jus ensemencés sont moins sensibles à l'action de la thiamine que les jus naturels.

Les jus désulfités fermentent moins rapidement et moins intensément que les jus frais, mais fermentent totalement.

La thiamine permet d'obtenir des fermentations plus rapides, mais n'élimine pas le retard au départ.

Les levures activent notablement la fermentation.

L'action des levures est supérieure à celle de la vitamine B₁.

Les jus ensemencés sont moins sensibles à l'influence de la thiamine que les jus non ensemencés.

L'addition des bourbes éliminées par la sulfitation ne provoque pas d'amélioration sensible de la fermentation.

D'une manière générale, des jus de raisin désulfités et ensemencés uniquement ou bien ensemencés et additionnés de vitamine B₁, présentent, dans la plupart des cas, des courbes de fermentation analogues à celles des jus frais.

La constitution des jus de raisin sulfités-désulfités ne paraît pas être altérée profondément si l'on prend comme critère leur potentiel fermentaire.

Il apparaît de plus que les levures ajoutées à un jus de raisin *frais* ou *désulfité*, régularisent la fermentation.

Elles lui confèrent un « pouvoir tampon fermentaire », c'est-à-dire qu'elles atténuent l'influence que des facteurs externes peuvent exercer sur le déroulement normal de la fermentation.

D'après cette expérimentation, il semble que le facteur ensemencement soit le facteur principal de la fermentation des jus mutés-désulfités.

Il faudra donc recommander dans le cas de fermentation d'un muté, un ensemencement massif (de l'ordre de 2 · 10⁶ ou plus, germes au ml).

Viennent ensuite les autres facteurs, comme la vitamine B₁, les autres biocatalyseurs, les sels ammoniacaux et les protéines.

Cette étude sur le potentiel fermentaire des mutés sera complétée par une étude sur la valeur et la composition des vins de mutés.

Reçu pour publication en mai 1963.

SUMMARY

THE FERMENTATION OF FRESH AND DESULPHITED GRAPE JUICE. THE INFLUENCE OF YEASTS AND THIAMINE

The spontaneous alcoholic fermentation of grape juice which had been treated with sulphite and subsequently desulphited was compared with that of fresh juice, both before and after the addition of yeasts and thiamine, and the following results were obtained:

- the addition of thiamine to fresh juice produced no significant action, while inoculation with *Saccharomyces ellipsoideus* at the rate of 2 million per ml provoked a feeble response ;
- desulphited juice fermented completely but more slowly than fresh juice ;
- the addition of thiamine caused an acceleration of fermentation in desulphited juice, but had the contrary effect in fresh juice ;
- it was chiefly by the inoculation with yeasts that the sulphited-desulphited juice was able to reach the speed of fermentation of fresh juice ;
- wines produced from sulphited-desulphited juice possessed the characteristics of greater maturity (colour less emphasized, lower acidity, greater harmony of constitution).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CASAS LUCAS J. F., 1954. Vitamina B₁ como activador de la fermentacion vinica. *Consejo Superior de Investigaciones científicas, Madrid ; Seccion de Fermentaciones industriales, Cuaderno n° 7.*
- DUPUY P., FLANZY M., 1954. Influence de la thiamine sur la fermentation du jus de raisin. *C. R. Acad. Agric.*, **40**, 273-276.

- DUPUY P., NORTZ M., PUISAIS J., 1955. Les moûts de la Vienne et la vitamine B₁ en 1953. *C. R. Acad. Agric.*, **41**, 56-58.
- FLANZY M., BOUZIGUES M^{me} L., BOUZIGUES H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin, par le mélange sulfo-chromique. *Ann. Technol. Agric.*, **4**, 397-415.
- FLANZY M., POUX Ch., 1958. Les possibilités de la microvinification, application à l'étude de la macération. *Ann. Technol. Agric.*, **7**, 377-401.
- FLANZY M., ANDRÉ P., 1959. Désulfitation des jus de raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **8**, 171-192.
- GARINO-CANINA E., TREVISIOL E., 1954. X^e Congreso Internacional de Industrias Agrícolas, Madrid, 1912-1923.
- KNUCHEL F., DESHUSSES L., CORBAZ J., 1954. Influence de la vitamine B₁ et de quelques sels minéraux sur la fermentation alcoolique du jus de raisin et la rétrogradation malolactique. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **9**, 39-43.
- LAFOURCADE M^{lle} S., 1954. Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **3**, 283-333.
- NEGRE E., FRANÇOT P., 1943. Vins de mutés. *Bull. Inter. Vin*, **16**, 34-44.
- NEGRE E., 1947. Vinification des mutés. *Progr. Agr. Vit.*, **64**, 284-287.
- OURNAC M^{lle} A., FLANZY M., 1957. Localisation et évolution de la vitamine B₁ dans le raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. Agric.*, **6**, 257-292.
- RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1952. Sur l'emploi en vinification de quelques activeurs vitaminiques de la fermentation. *C. R. Acad. Agric.*, **38**, 444-448.
- RIBEREAU-GAYON J., RIBEREAU-GAYON P., 1953. Étude expérimentale de la vinification en rouge. I. Dispositifs utilisés. *Chim. et Ind.*, **70**, 416-419; II. Expérimentation 1952. *Chim. et Ind.*, **70**, 694-700.
- SCHULTZ A., ATKIN L., FREY C. N., 1937. A fermentation test for vitamin B₁. I. *J. Amer. Chem. Soc.*, **59**, 948.
- SCHULTZ A., ATKIN L., FREY C. N., 1937. A fermentation test for vitamin B₁. II. *J. Amer. Chem. Soc.*, **59**, 2457.
- SCHULTZ A., ATKIN L., FREY C. N., WILLIAMS R. R., 1941. Application of the sulfite cleavage of thiamin to the yeast fermentation method. *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 632.
- WILLIAMS R. R., WATERMAN R. E., KERESZTESY J. C., BUCHMAN E. R., 1935. Studies of crystalline Vitamin B₁. III. Cleavage of vitamin with sulfite. *J. Amer. Chem. Soc.*, **57**, 536-537.
-

ESSAIS COMPARATIFS DE VINIFICATION EN ROUGE

P. BENARD et C. JOURET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

On a comparé trois techniques d'élaboration des vins rouges : raisins entiers foulés, raisins foulés éraflés, raisins entiers non foulés (macération carbonique).

Trois séries d'essais ont été menées. On a noté les courbes de température et de fermentation durant la cuvaison et procédé à l'analyse des vins de goutte et de presse ainsi qu'à celle du mélange de ces vins.

Des différences caractéristiques entre ces techniques ont ainsi été soulignées.

I. — INTRODUCTION

Les essais comparatifs effectués en 1961 (P. BENARD et C. JOURET, 1962) au Domaine expérimental de la Station centrale de Technologie des Produits végétaux de Narbonne, sur trois techniques de vinification en rouge : raisins entiers foulés, raisins foulés et éraflés, raisins entiers non foulés (macération carbonique) ont été repris aux vendanges de 1962.

II. — MÉTHODE EXPÉRIMENTALE ET MATÉRIEL UTILISÉ

Les trois cuves utilisées pour chacun des essais, d'une contenance de 110 hl pour les raisins entiers foulés et les raisins foulés et éraflés et de 140 hl pour la macération carbonique, ont été remplies en même temps. Pour avoir des lots de vendange aussi comparables que possible, chaque parcelle homogène était récoltée rang par rang à l'aide de comportes en bois et les raisins répartis alternativement dans chacune des cuves. Cette année, les raisins entiers étaient foulés à l'aide d'un nouveau fouloir possédant des rouleaux de caoutchouc, un conquet en acier inoxydable et un bac de réception de la

vendange en « peralument » (alliage d'Al avec 26 à 32 p. 100 de Mn, 0,05 p. 100 de Cu et 0,30 p. 100 de Cr). Cet alliage est attaqué par les vins mais dans nos conditions expérimentales ne l'a pas été par les moûts.

Le tuyau d'amenée de la vendange foulée dans la cuve est en acier inoxydable.

L'éraflage s'est effectué à l'aide d'un fouloir-érafloir vertical placé directement sur la trappe de la cuve.

Pour la macération carbonique, les comportes de raisin sont versées directement dans la cuve par la trappe ; les premières grappes, en tombant, s'écrasent et le moût ainsi libéré est le siège d'une fermentation alcoolique normale qui produit l'atmosphère de gaz carbonique nécessaire, dans cette technique, aux autres grains entiers. On ferme la trappe de la cuve et on laisse ainsi pendant une dizaine de jours ou plus (M. FLANZY, 1935).

Cette année également, un pressoir horizontal VASLIN à rebêchage automatique par chaînes en acier inoxydable remplace le pressoir hydraulique discontinu précédemment utilisé.

Les cuves de raisins foulés entiers et de raisins éraflés ont reçu 5 g de SO_2 pour 130 kg de vendange, tandis que la cuve de macération carbonique ne recevait aucune addition d'anhydride sulfureux.

Trois séries d'essais ont été menés.

L'encépagement était composé de *Carignan noir* pour le premier essai ; d'un mélange de 47 p. 100 de *Carignan noir*, 34 p. 100 de *Carignan blanc* et 19 p. 100 de *Grenache blanc et gris* pour le second essai ; tandis que le troisième essai contenait une très forte proportion de cépages blancs avec 41 p. 100 de *Clairette*, 35 p. 100 de *Carignan blanc*, 10 p. 100 de *Carignan noir*, 9 p. 100 de *terret* et 6 p. 100 de *Cinsault*.

III. RÉSULTATS

A. — COURBES DE TEMPÉRATURE ET DE FERMENTATION

Les figures suivantes donnent les courbes de température et de fermentation.

Les températures de fermentation des cuves de vendange entière foulée et de vendange foulée et éraflée sont peu différentes ; la température maxima atteinte par les raisins entiers foulés a été de 0°,5 et 1°,5 supérieure à celle des raisins foulés et éraflés pour les deux premiers essais et de 1° inférieur pour le troisième essai.

La température maxima des cuves de macération carbonique est toujours nettement plus basse : de 4°C à 10°C ; cette température maxima est atteinte plus lentement que dans les deux techniques précédentes ; dans ce cas, la dégradation des sucres est moins rapide ce qui permet un meilleur échange thermique.

Les cuves des raisins entiers, foulés sont entrées plus tôt en fermentation et se sont terminées plus rapidement que celles des raisins foulés éraflés : une demi-journée à deux jours et demi pour la même densité de décuvage. Celle-ci a toujours été voisine de 1 000 à 1 010.

Les cuves de macération carbonique sont restées dix jours en atmosphère carbonique ; le vin de goutte avait une densité de 995 et celui de presse de 1 010 à 1 020.

B. — RENDEMENTS

Le volume du vin de goutte représente le liquide recueilli par égouttage des cuves pendant une nuit.

Le pressurage comprenait quatre serrages suivis d'un émiettage automatique du marc par les chaînes en acier inoxydable. Les pressions étaient de 3 kg/cm² pour le premier serrage, 4 kg/cm² pour le second, et 5 kg/cm² pour les deux derniers.

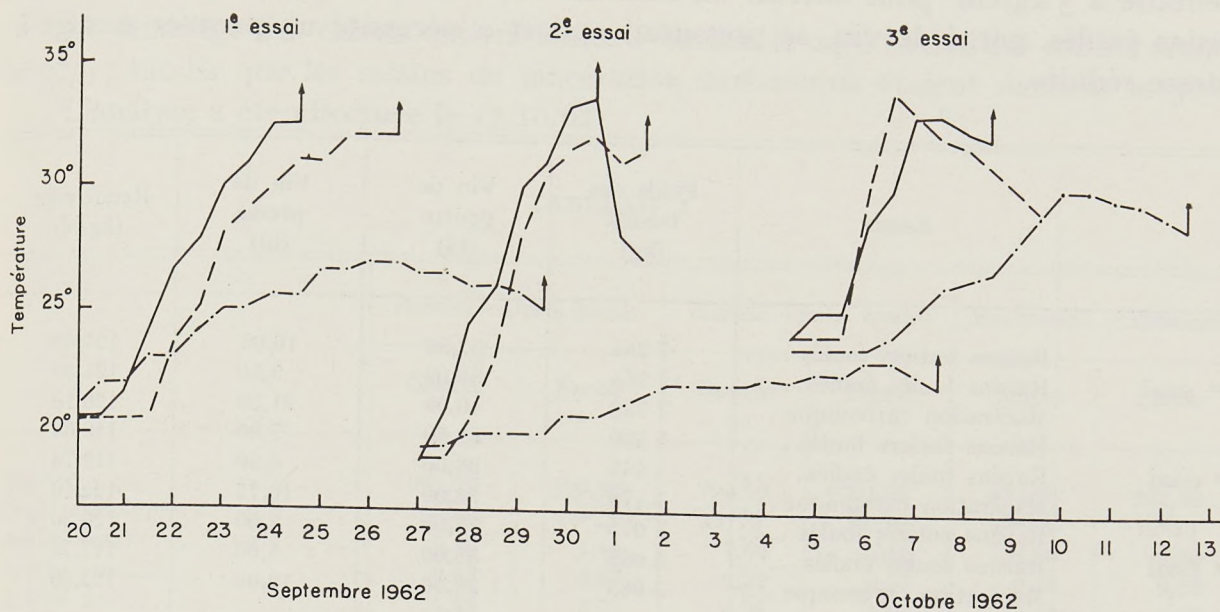


FIG. 1. — Courbes de température

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . - . Raisins entiers, non foulés

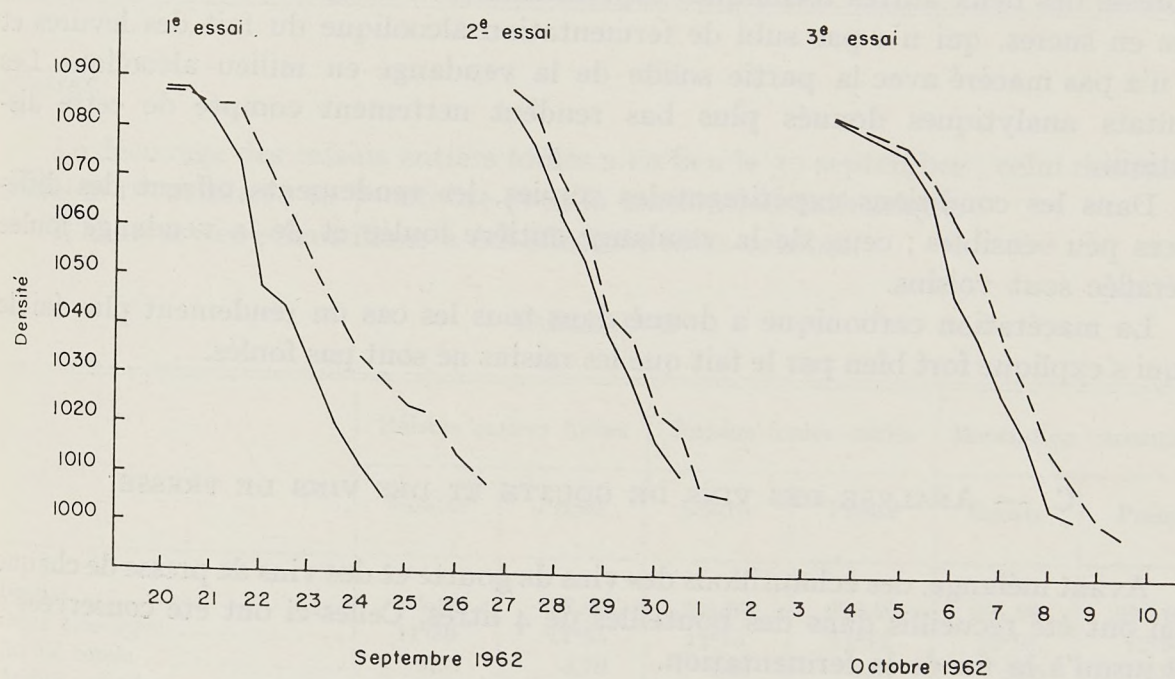


FIG. 2. — Courbes de fermentation

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés éraflés

Les raisins des cuves de macération carbonique ont nécessité un serrage supplémentaire à 5 kg/cm² pour obtenir un meilleur éclatement des grains. Le marc des raisins éraflés, gorgé de vin, se pressurait mal et a nécessité un premier serrage à vitesse réduite.

	Essais	Poids des raisins (kg)	Vin de goutte (hl)	Vin de presse (hl)	Rendement (kg/hl)
1 ^{er} essai	Raisins entiers foulés	7 768	52,50	10,00	124,60
	Raisins foulés éraflés.....	7 764	53,00	9,50	124,20
	Macération carbonique ...	7 753	40,00	21,50	126,10
	Raisins entiers foulés	5 430	39,00	7,00	118,00
2 ^e essai	Raisins foulés éraflés.....	5 445	39,00	6,50	119,70
	Macération carbonique ..	5 478	28,00	16,75	122,40
	Raisins entiers foulés	5 075	35,00	7,00	120,90
	Raisins foulés éraflés.....	5 065	38,00	5,00	117,70
3 ^e essai	Macération carbonique ...	5 065	29,50	12,00	122,00

On pourrait s'étonner du volume important du vin de presse de la macération carbonique ; il faut souligner que le terme dans ce cas est inexact : certes, il s'agit du liquide recueilli par pressurage mais c'est le seul caractère commun avec les vins de presse des deux autres techniques expérimentales. Il s'agit ici d'un moût encore riche en sucres, qui n'a pas subi de fermentation alcoolique du fait des levures et qui n'a pas macéré avec la partie solide de la vendange en milieu alcoolique. Les résultats analytiques donnés plus bas rendent nettement compte de cette distinction.

Dans les conditions expérimentales suivies, les rendements offrent des différences peu sensibles ; ceux de la vendange entière foulée et de la vendange foulée et éraflée sont voisins.

La macération carbonique a donné dans tous les cas un rendement plus faible ce qui s'explique fort bien par le fait que les raisins ne sont pas foulés.

C. — ANALYSE DES VINS DE GOUTTE ET DES VINS DE PRESSE

Avant mélange, des échantillons des vins de goutte et des vins de presse de chaque essai ont été recueillis dans des bouteilles de 4 litres. Celles-ci ont été conservées à 26° jusqu'à la fin de la fermentation.

1^o) Analyses courantes

Les méthodes analytiques utilisées sont celles décrites dans : « Analyse des Vins » JAULMES P. (1951). L'alcool éthylique est dosé après distillation par aérométrie le fer total par la méthode à l'orthophénanthroline DEIBNER L.-BOUZIGUES H. (1952).

1^{er} essai.

Le décuvage des raisins entiers foulés a eu lieu le 24/9 ; celui des raisins éraflés le 26/9 ; tandis que les raisins de macération carbonique étaient décuvés le 30/9. L'analyse a été effectuée le 17/10/62.

TABLÉAU I

	Raisins entiers foulés		Raisins foulés éraflés		Macération carbonique	
	Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
Densité	995,10	999,80	995,70	1001,90	996,90	992,40
Degré alcoolique.....	11°65	10°95	11°70	11°10	10°78	12°45
Acidité totale	4,90	4,45	4,60	4,60	3,80	3,10
Acidité volatile.....	0,42	0,67	0,22	0,57	0,38	0,28
Acidité fixe	4,48	3,78	4,38	4,03	3,42	2,82
pH.....	3,55	3,60	3,50	3,65	3,60	3,70
Extrait sec	27,17	33,97	26,02	42,95	26,31	20,81
Cendres.....	3,85	4,39	3,26	4,14	3,75	3,05
Alcalinité des cendres	38,50	43,00	37,30	39,80	39,50	30,00
Sucres	2,60	2,54	2,86	3,43	2,60	2,01
Éthanal mg/litre	25,60	7,80	26,20	7,00	9,00	8,00
Fer mg/litre	6,00	6,00	16,00	8,00	4,00	5,50

2^e essai.

Le décuvage des raisins entiers foulés a eu lieu le 30 septembre ; celui des raisins éraflés le 1^{er} octobre ; le 7 octobre pour la macération carbonique. L'analyse des échantillons a été effectuée le 22 octobre.

TABLÉAU 2

	Raisins entiers foulés		Raisins foulés éraflés		Macération carbonique	
	Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
Densité	994,90	997,40	994,30	999,40	994,90	991,10
Degré alcoolique.....	11°80	11°35	12°15	11°12	11°10	12°96
Acidité totale	3,90	3,70	4,10	4,00	2,95	2,90
Acidité volatile.....	0,16	0,40	0,20	0,27	0,24	0,28
Acidité fixe	3,74	3,30	3,90	3,73	2,71	2,52
pH.....	3,50	3,60	3,40	3,50	3,65	3,70
Extrait sec	23,68	28,65	22,95	32,60	22,68	17,68
Cendres	3,52	3,59	3,45	3,64	3,75	2,86
Alcalinité des cendres	35,75	37,50	36,25	39,00	35,75	29,00
Sucres	1,95	2,03	2,34	2,58	1,92	1,51
Éthanal mg/litre	24,00	10,60	28,20	18,50	8,00	8,80
Fer mg/litre.....	7,00	7,00	15,00	8,40	5,00	5,20

3^e *essai*.

Le décuvage des raisins entiers foulés a eu lieu le 8 octobre ; celui des raisins éraflés le 9 et celui de la macération carbonique le 12.
L'analyse des échantillons a été effectuée le 5 novembre.

TABLEAU 3

	Raisins entiers foulés		Raisins foulés éraflés		Macération carbonique	
	Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
Densité	995,60	998,00	994,80	1000,70	996,90	992,80
Degré alcoolique.....	10°85	10°40	11°05	10°05	10°25	11°75
Acidité totale	3,15	3,60	3,40	3,50	2,95	2,85
Acidité volatile	0,28	0,71	0,31	0,53	0,26	0,28
Acidité fixe	2,87	2,89	3,09	2,97	2,69	2,57
pH.....	3,70	3,74	3,65	3,75	3,80	3,85
Extrait sec.....	22,32	26,90	22,00	32,50	21,70	18,40
Cendres.....	3,37	3,90	3,32	4,25	3,50	3,05
Alcalinité des cendres	34,25	39,00	32,50	41,50	33,50	30,00
Sucres	2,01	2,50	2,00	3,05	1,69	1,46
Éthanal mg/litre.....	37,20	7,00	35,20	8,80	6,06	7,04
Fer mg/litre.....	4,50	4,00	18,20	8,20	1,50	4,00

2^o) *Fermentation malolactique*

Elle a été suivie par chromatographie sur papier.

TABLEAU N^o 4

	1 ^{er} <i>essai</i>		2 ^e <i>essai</i>		3 ^e <i>essai</i>	
	17/10/62		22/10/62		5/11/62	
	Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
Raisins foulés.....	—	+	+	+	+	+
Raisins éraflés.....	—	+	—	+	—	+
Macération carbonique	+	+	+	+	+	+

3^o) *Substances colorantes*

L'évaluation des matières colorantes a été faite par spectrophotométrie d'absorption dans le visible avec quelques variantes de la technique indiquée par SUDRAUD (1958).

TABLEAU 5

		Raisins entiers foulés		Raisins foulés éraflés		Macération carbonique	
		Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
1 ^{er} essai	<i>Densité optique</i>						
	minimum	0,346	0,623	0,330	0,725	0,293	0,285
	maximum	0,540	0,875	0,510	1,050	0,440	0,390
	Σ	0,886	1,498	0,840	1,775	0,733	0,675
2 ^e essai	<i>Densité optique</i>						
	minimum	0,143	0,290	0,158	0,368	0,142	0,141
	maximum	0,198	0,355	0,240	0,478	0,192	0,170
	Σ	0,341	0,645	0,398	0,846	0,334	0,311
3 ^e essai	<i>Densité optique</i>						
	minimum	0,071	0,180	0,064	0,232	0,100	0,101
	maximum	0,078	0,190	0,072	0,249	0,109	0,103
	Σ	0,149	0,370	0,136	0,481	0,209	0,204

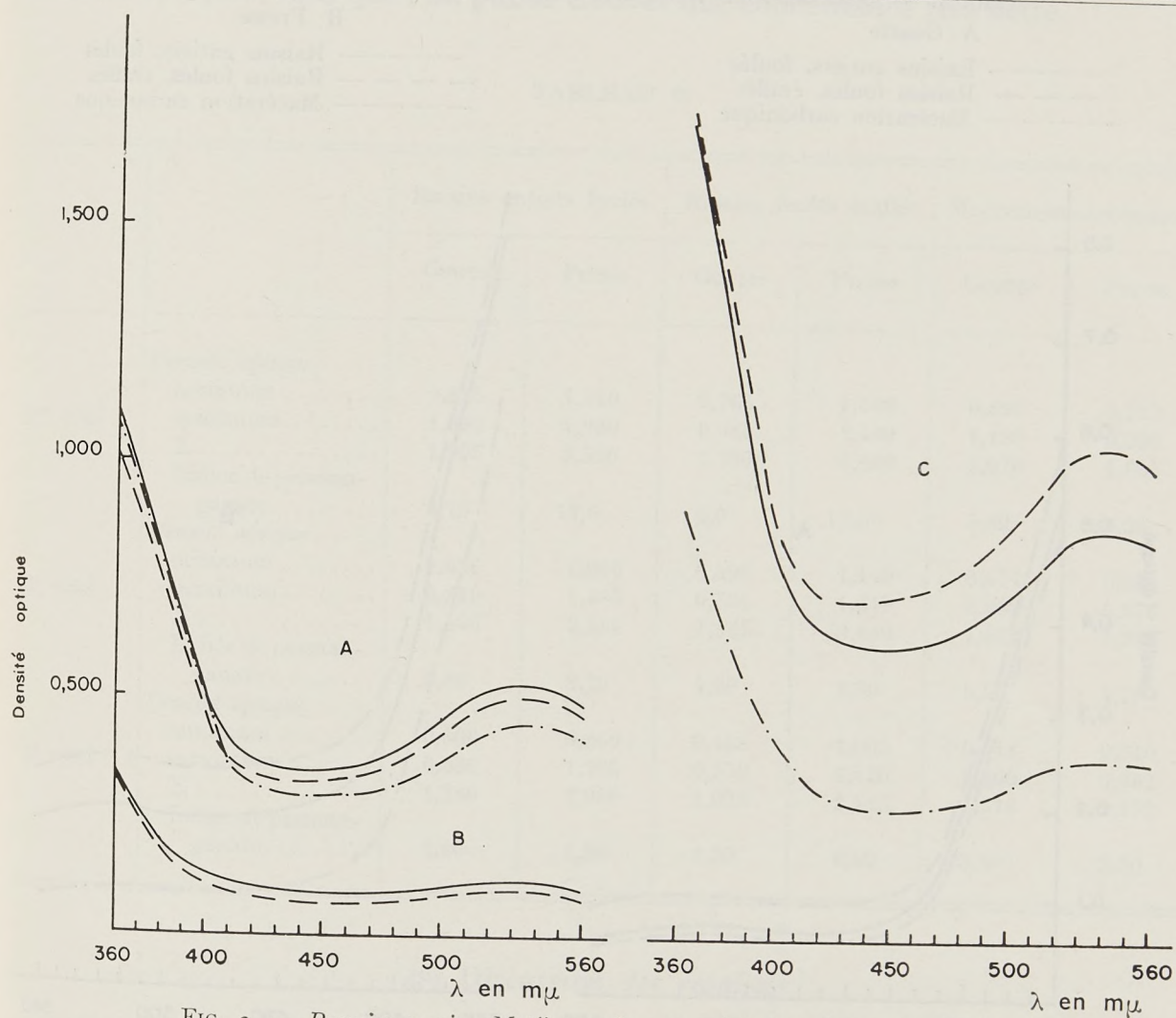


FIG. 3. — Premier essai : Matières colorantes (courbes d'absorption)

B Moût initial

A Goutte

C Presse

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - · - · - Macération carbonique

— Vendange entière
 - · - · - Vendange éraflée

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - · - · - Macération carbonique

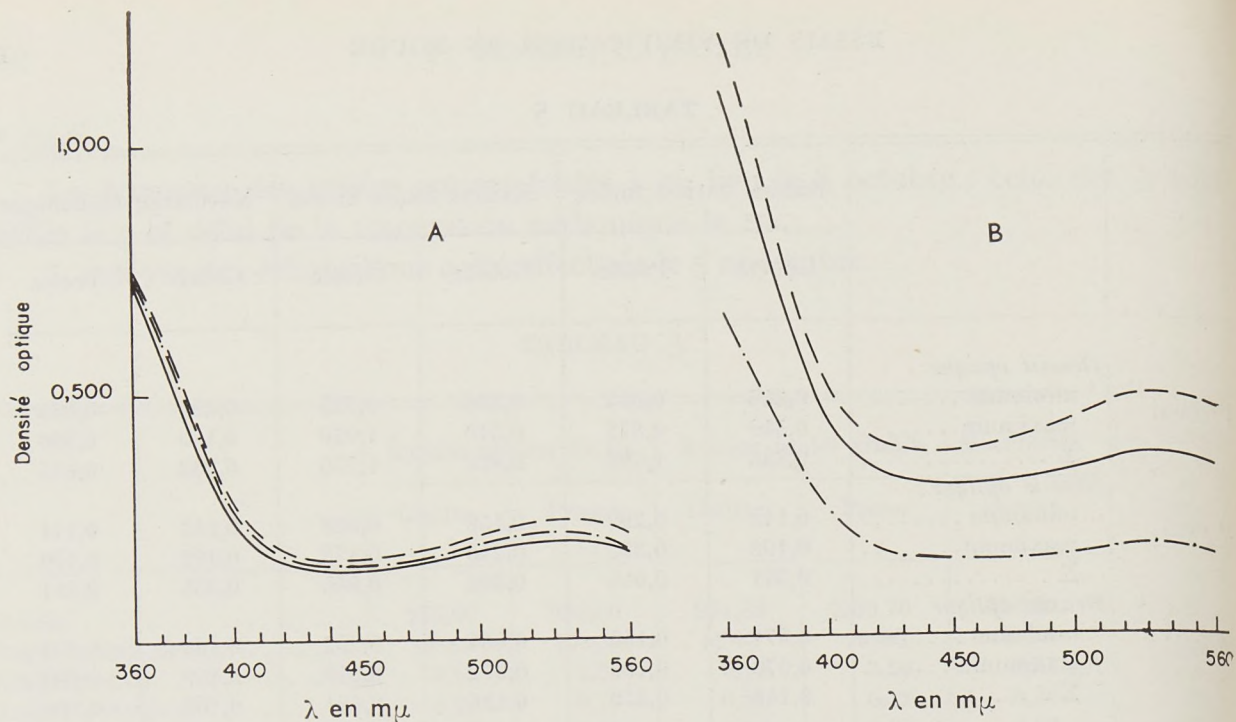


FIG. 4. — Deuxième essai : Matières colorantes (courbes d'absorption)

A Goutte

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . . . Macération carbonique

B Presse

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . . . Macération carbonique

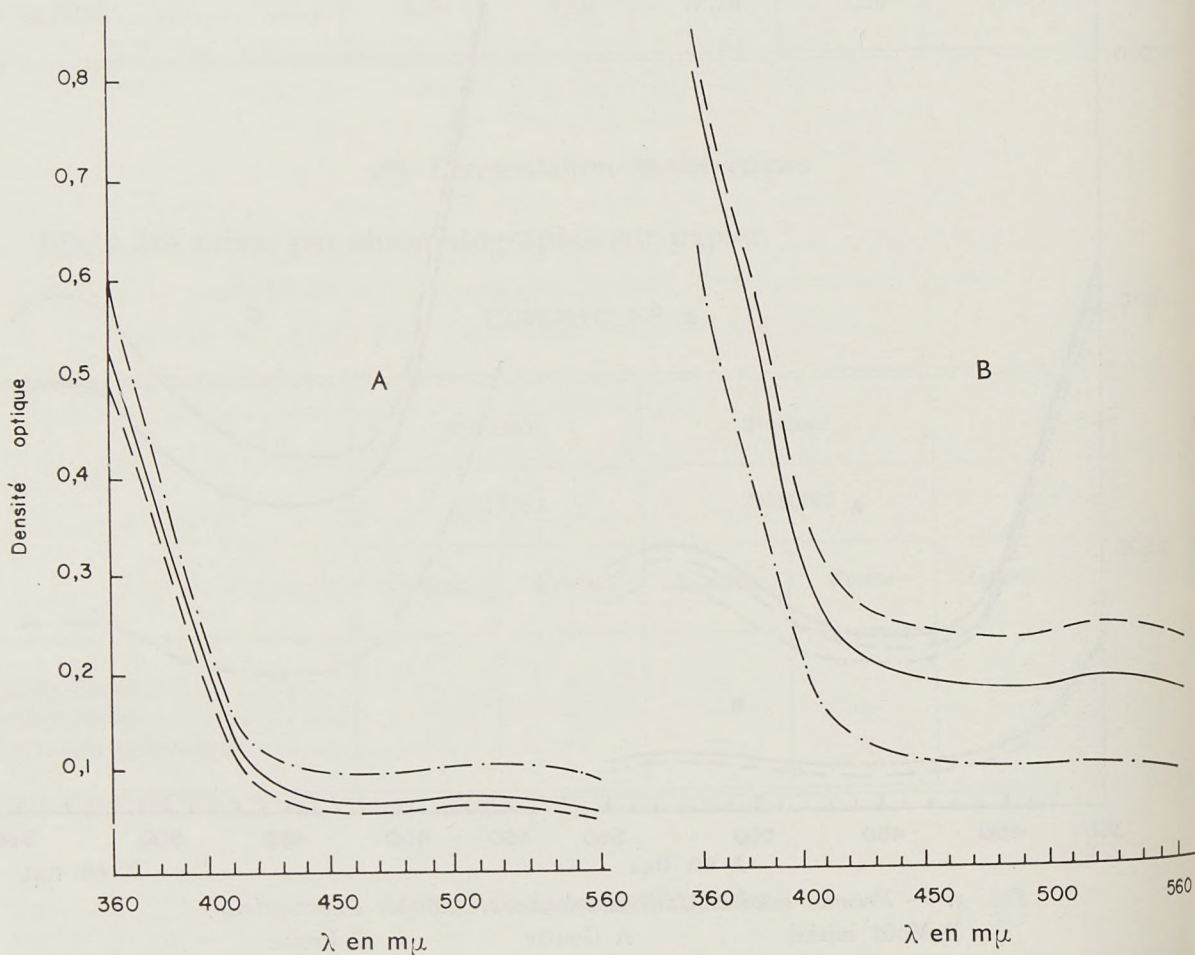


FIG. 5. — Troisième essai : Matières colorantes (courbes d'absorption)

A Goutte

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . . . Macération carbonique

B Presse

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . . . Macération carbonique

L'échantillon était dilué au 1/10 par de l'alcool à 50° et la cuve spectrophotométrique avait 1 cm d'épaisseur. On a rapporté les courbes obtenues et rassemblé dans un tableau, les densités optiques maxima et minima ainsi que la somme de ces deux chiffres qui donne un ordre de grandeur comparatif de l'intensité colorante des vins.

Substances tannoïdes.

L'évaluation des substances tannoïdes globales a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet après dilution au 1/50 dans l'alcool à 50°. On a rapporté les courbes obtenues et rassemblé dans le tableau suivant les densités optiques minima et maxima ainsi que la somme de ces deux chiffres.

On a effectué également l'appréciation de ces substances par la technique de l'indice de permanganate suivant RIBÉREAU-GAYON et MAURIE (1942). Le chiffre rapporté correspond au nombre de ml de permanganate N/100 pour un ml de vin. On note une relation entre le chiffre de l'indice de permanganate et la somme des densités optiques, sans que l'on puisse trouver une concordance très nette.

TABLEAU 6

		Raisins entiers foulés		Raisins foulés éraflés		Macération carbonique	
		Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
1 ^{er} essai	<i>Densité optique</i>						
	minimum	0,825	1,540	0,765	1,580	0,890	0,735
	maximum.....	1,080	1,980	0,985	2,100	1,180	0,920
	Σ	1,905	3,520	1,750	3,680	2,070	1,655
	Indice de permanganate.....	6,10	11,0	6,0	12,50	5,80	5,50
2 ^e essai	<i>Densité optique</i>						
	minimum	0,636	1,050	0,590	1,140	0,674	0,554
	maximum.....	0,810	1,384	0,734	1,540	0,898	0,676
	Σ	1,446	2,434	1,324	2,680	1,572	1,230
	Indice de permanganate.....	5,80	8,20	4,90	8,30	6,00	4,70
3 ^e essai	<i>Densité optique</i>						
	minimum	0,500	0,860	0,458	1,005	0,518	0,510
	maximum.....	0,680	1,200	0,570	1,420	0,800	0,662
	Σ	1,180	2,060	1,028	2,425	1,318	1,172
	Indice de permanganate.....	2,80	4,90	2,30	6,40	3,30	2,70

4^o) *Discussion des résultats*

Pour chacune des trois techniques de vinification en rouge que nous venons d'étudier, ces analyses montrent des différences fondamentales entre vins de goutte et vins de presse correspondant.

Dans les vins de presse de vendange entière et de vendange éraflée, on note,

comme cela est connu, une densité plus élevée, un extrait sec et une alcalinité des cendres corrélative plus importants, une acidité volatile et un taux de matières réductrices élevés ainsi qu'un degré alcoolique plus faible que pour le vin de goutte correspondant.

C'est l'inverse dans le cas de la macération carbonique et le vin de presse a ici, une densité plus faible, un extrait sec, une alcalinité des cendres et une acidité vola-

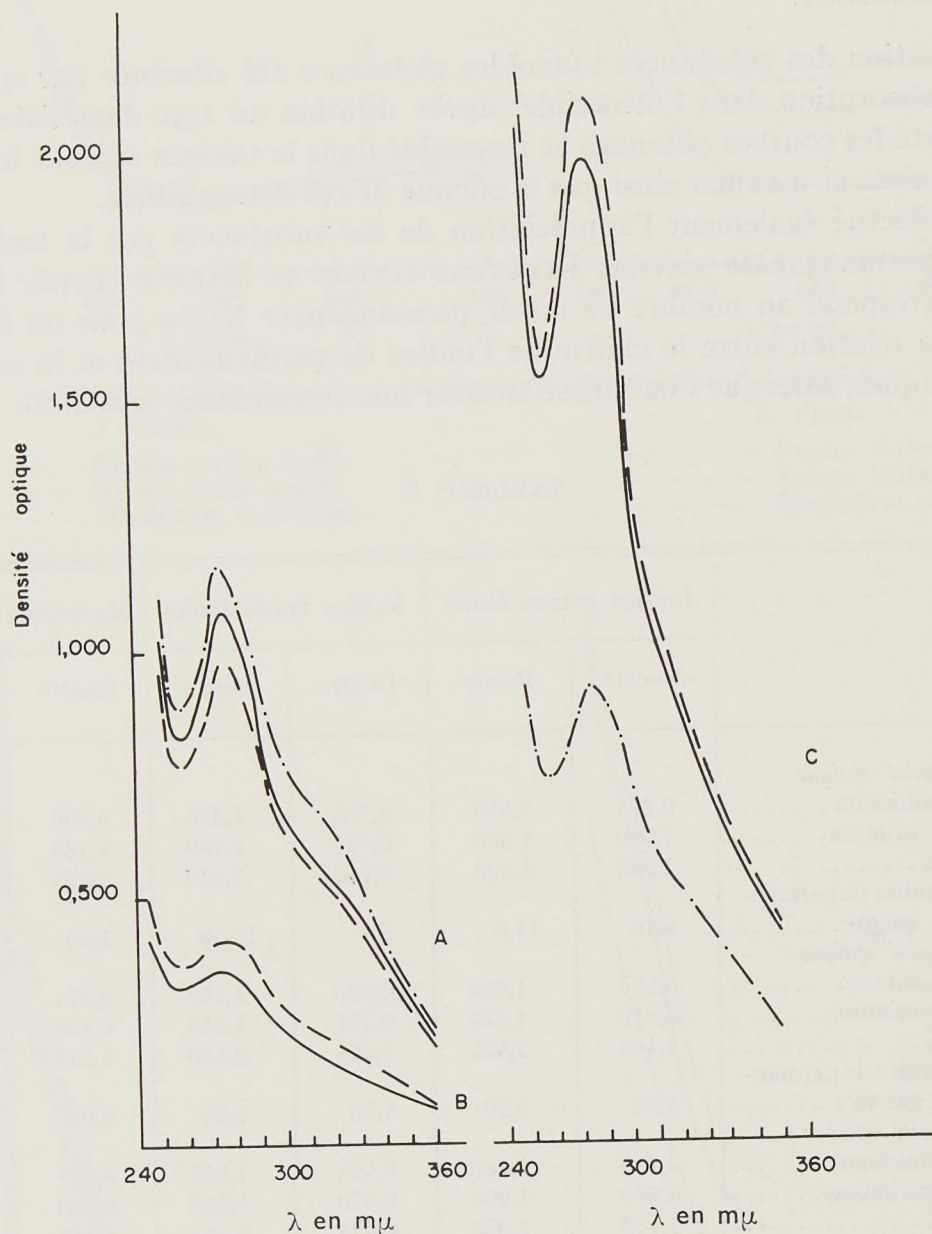


FIG. 6. — Premier essai : Substances tannoides (courbes d'absorption)

A Goutte
B Moût initial
C Presse

A
—— Raisins entiers, foulés
—— Raisins foulés éraflés
-.-.- Raisins entiers, non foulés

B
—— Vendange éraflée, foulée
—— Vendange entière, foulée

C
—— Raisins entiers, foulés
—— Raisins foulés, éraflés
-.-.- Raisins entiers, non foulés

tile également plus faibles de même que le taux des matières réductrices, un degré alcoolique, par contre, nettement plus élevé que ceux du vin de goutte correspondant. Cette dernière observation souligne l'intérêt d'un pressurage correct pour avoir un degré alcoolique final comparable à celui obtenu dans les autres techniques de vinification.

Le taux d'éthanal est plus important dans les vins de goutte de la vendange entière foulée et de la vendange éraflée que dans les autres échantillons.

Pourtant des essais, non encore publiés, ont montré que des quantités notables d'éthanal, de l'ordre de 70 mg/l se forment durant la macération carbonique, mais

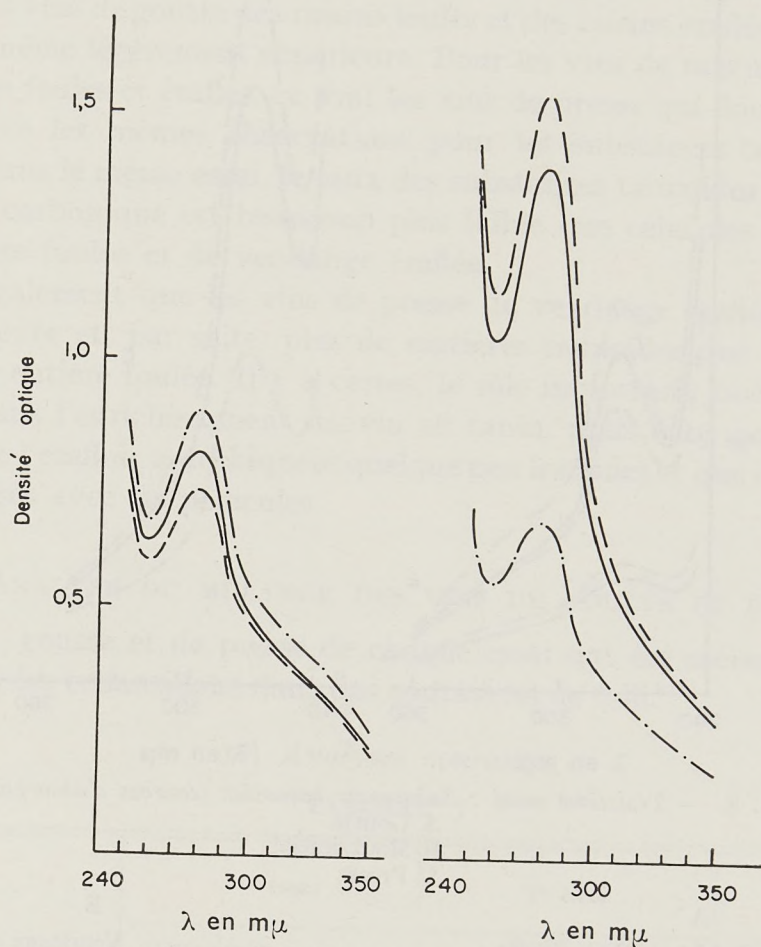


FIG. 7. — Deuxième essai : Substances tanniques (courbes d'absorption)

A Goutte

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . . . Macération carbonique

B Presse

— Raisins entiers, foulés
 - - - Raisins foulés, éraflés
 - . . . Macération carbonique

diminuent sérieusement dans le vin fait. Cela pourrait s'expliquer par une évolution ultérieure dans le cycle de la fermentation alcoolique qui suit la macération carbonique, ou par une volatilité, facilitée par l'absence de SO_2 .

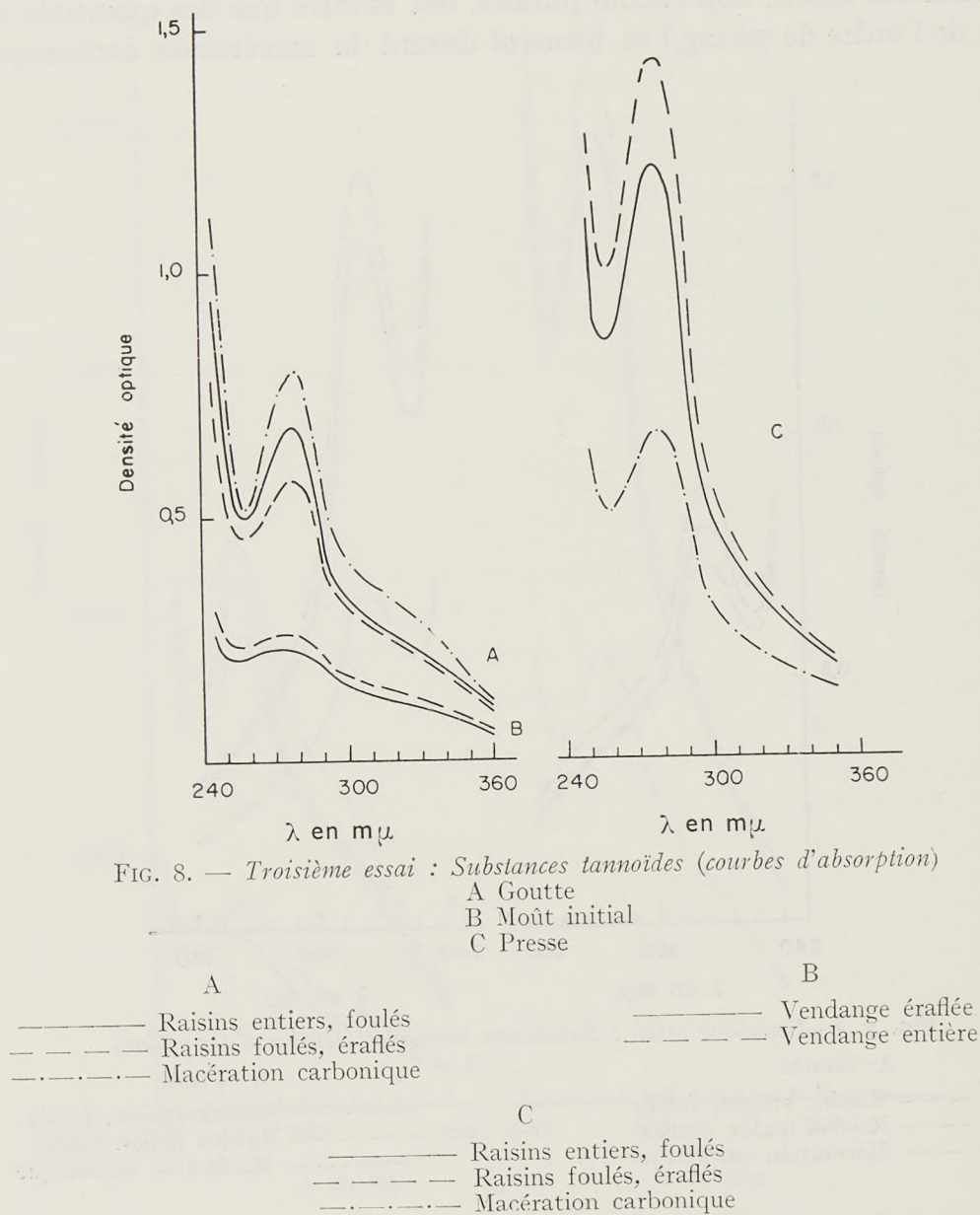
On confirme, en outre, dans ces essais, le rôle important joué par le matériel dans l'enrichissement en fer du vin.

Le vin de macération carbonique contient des quantités faibles de fer provenant du raisin. Dans les vins de vendange entière foulée, on note un léger enrichissement en fer dû à la macération des parties solides du raisin en milieu alcoolique, mais ces doses restent très en deçà de la limite dangereuse, tandis que pour le vin de la vendange

éraflée, l'éraffoir en fer enrichit sérieusement le milieu en ce métal bien qu'une peinture de protection soit passée en début de vendange sur toutes les pièces métalliques de l'appareil.

Le vin de goutte plus en contact avec ces pièces métalliques que le jus de presse contient plus de fer.

Ces observations ont d'ailleurs fait l'objet d'une note (BENARD P. et JOURET C., 1963).



Tous les échantillons de vin de macération carbonique subissent très rapidement la fermentation malolactique.

Les vins de goutte, surtout ceux des raisins éraflés, atteignent plus lentement leur stabilité biologique. La température des échantillons étant restée constante et élevée (26°C), il pourrait s'agir d'une action retardatrice due soit à la présence du SO_2 , soit à l'absence d'éléments utiles aux bactéries malolactiques contenus dans les vins de presse et non dans ceux de goutte ou plus simplement à l'acidité : les échantillons qui n'ont pas subi la fermentation malolactique ont initialement le pH le plus bas.

Le 22 janvier 1963, tous les échantillons n'avaient plus d'acide malique décelable par chromatographie sur papier.

On constate une différence fondamentale entre les vins de goutte et de presse des techniques de vinification expérimentées au point de vue matières colorantes : les vins de presse des essais des raisins entiers foulés et des raisins éraflés sont nettement plus colorés que les vins de goutte correspondants du fait de la macération de la partie solide de la vendange en milieu alcoolique tandis que pour la macération carbonique, les vins de goutte et les vins de presse sont pratiquement de la même couleur.

On peut remarquer que dans cette dernière technique, l'intensité colorante est voisine de celle des vins de goutte des raisins foulés et des raisins éraflés ; pour le troisième essai, elle est même légèrement supérieure. Pour les vins de raisins foulés entiers, et ceux des raisins foulés et éraflés, ce sont les vins de presse qui donnent la couleur.

On retrouve les mêmes observations pour les substances tannoïdes ; on peut souligner que dans le même essai, le taux des substances tannoïdes des vins de presse de macération carbonique est beaucoup plus faible que celui des vins de presse de vendange entière foulée et de vendange éraflée.

On note également que les vins de presse de vendange éraflée ont une densité optique plus élevée et, par suite, plus de matières tannoïdes que les vins de presse de la vendange entière foulée. Il y a certes, le rôle important joué par les pellicules et les pépins dans l'enrichissement du vin en tanin, mais dans notre cas, il y a en outre le fait que l'éraflage a déchiqueté quelque peu les rafles et que de nombreux fragments sont passés avec les pellicules.

D. — ANALYSE DU MÉLANGE DES VINS DE GOUTTE ET DE PRESSE

Les vins de goutte et de presse de chaque essai ont été mélangés au soutirage et on a conservé les échantillons dans des containers de 6 hl.

1^o) Analyses courantes

TABEAU 7

	1 ^{er} essai			2 ^e essai			3 ^e essai		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Densité.....	995,9	996,6	994,6	994,5	993,9	992,9	995,1	994,6	994,3
Degré alcoolique	11°50	11°63	11°53	11°73	11°88	11°80	10°68	10°90	10°75
Acidité totale	3,45	3,85	2,90	3,65	3,25	2,75	2,85	2,70	2,65
Acidité volatile	0,29	0,28	0,24	0,26	0,28	0,24	0,30	0,27	0,24
Acidité fixe	3,16	3,57	2,66	3,39	2,97	2,51	2,55	2,43	2,41
pH	3,62	3,52	3,66	3,56	3,62	3,70	3,65	3,72	3,77
Sucres.....	2,15	2,23	1,87	1,92	2,15	1,68	2,00	2,09	1,56
Extrait sec	25,60	26,39	22,25	22,50	22,09	19,38	21,35	20,82	19,39
Cendres	3,15	3,03	3,00	2,82	2,75	2,78	3,09	3,06	3,06
Alcalinité des cendres.....	33,25	32,75	31,50	31,00	29,50	28,00	30,25	28,75	29,25
Fer mg/litre	4,20	16,20	2,30	7,00	14,10	5,10	6,00	15,00	4,50

- I — Raisins entiers, foulés.
 II. — Raisins foulés, éraflés.
 III. — Macération carbonique.

On a procédé à l'analyse de ces vins qui représentent le produit normalement offert au consommateur en suivant le même processus analytique que pour les vins de goutte et les vins de presse précédemment analysés.

2^o) Fermentatation malolactique

On a suivi la disparition de l'acide malique par chromatographie sur papier.

TABLEAU 8

	2/10	12/10	25/10	17/11	29/11	2/1
1 ^{er} essai						
Raisins entiers	—	—	en cours	+	+	+
Raisins éraflés	—	—	—	—	—	—
Macération carbonique	début	+	+	+	+	+
2 ^e essai						
Raisins entiers		—	+	+	+	+
Raisins éraflés		—	en cours	+	+	+
Macération carbonique		+	+	+	+	+
3 ^e essai						
Raisins entiers			+	+	+	+
Raisins éraflés			en cours	+	+	+
Macération carbonique			+	+	+	+

Les vins de macération carbonique subissent toujours rapidement et très régulièrement la fermentation malolactique et les vins de vendange entière, foulée, un peu avant ceux de la vendange éraflée. Seul le premier échantillon de la vendange éraflée contient encore de l'acide malique alors que les échantillons correspondants en bouteilles, aussi bien que ceux de goutte que de presse n'en contiennent plus. Comme cela a été plusieurs fois démontré divers facteurs influent sur cette fermentation ; dans ce cas particulier la température semble avoir joué le rôle prépondérant.

3^o) Substances colorantes et tannoïdes

TABLEAU 9

	Substances tannoïdes			Substances colorantes			Indice de perman- ganate
	min.	max.	E	min.	max.	E	
1 ^{er} essai							
Raisins foulés, entiers	0,920	1,170	2,090	0,324	0,480	0,804	4,4
Raisins foulés, éraflés	0,890	1,110	2,000	0,345	0,548	0,893	4,2
Macération carbonique	0,785	0,970	1,755	0,275	0,392	0,667	3,9
2 ^e essai							
Raisins foulés, entiers	0,660	0,880	1,540	0,152	0,205	0,357	3,9
Raisins foulés, éraflés	0,608	0,785	1,393	0,149	0,206	0,355	3,4
Macération carbonique	0,550	0,730	1,280	0,131	0,164	0,295	3,2
3 ^e essai							
Raisins foulés, entiers	0,512	0,725	1,237	0,073	0,080	0,153	3,5
Raisins foulés, éraflés	0,470	0,640	1,110	0,070	0,078	0,148	2,8
Macération carbonique	0,512	0,710	1,222	0,086	0,095	0,181	3,5

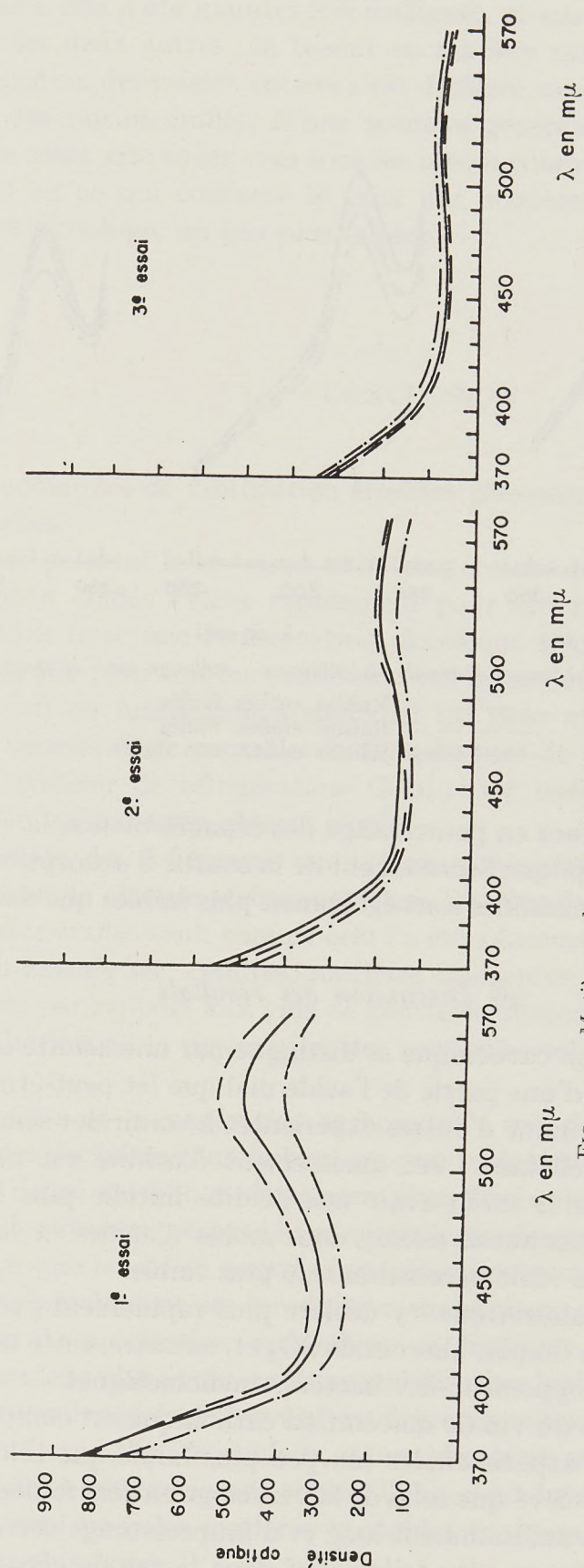


FIG. 9. — Matières colorantes (containers : mélange goutte et presse)

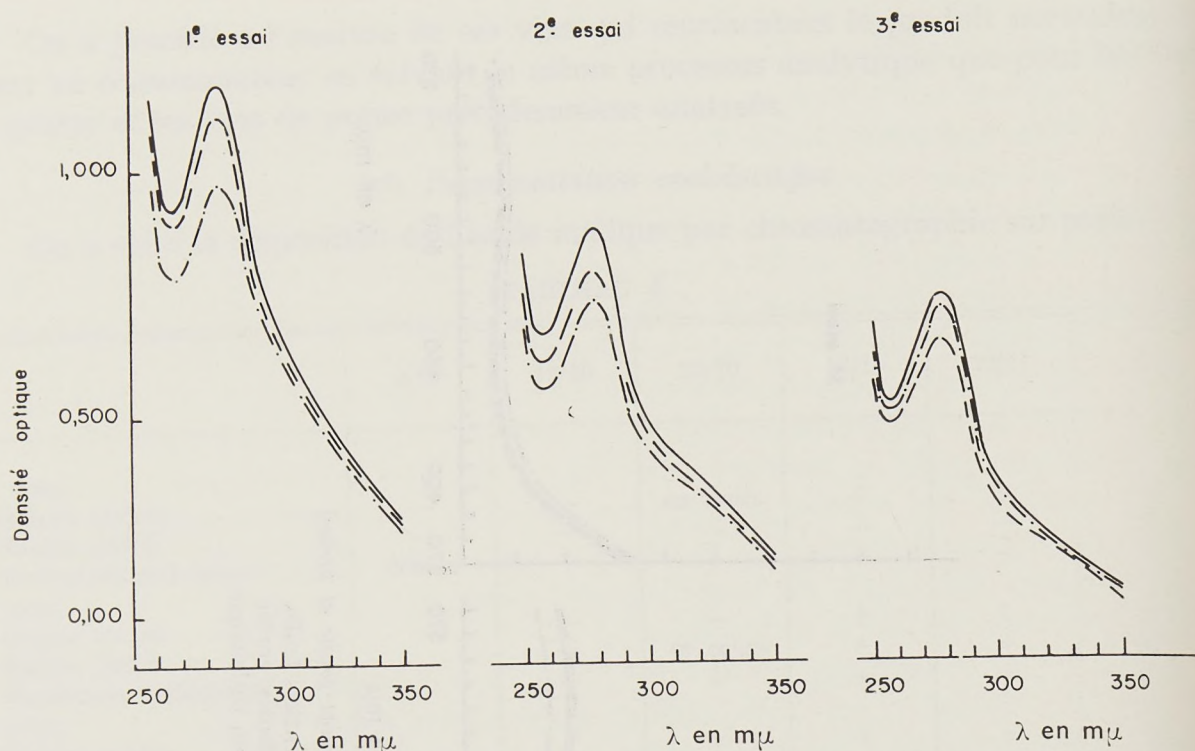


FIG. 10. — Substances tannoïdes (Containers : mélange vins de goutte et de presse)

— Raisins entiers foulés
 - - - Raisins éraflés, foulés
 - · - · - Raisins entiers non foulés

Du fait de l'importance en pourcentage des cépages blancs, le vin du 3^e essai est très peu coloré, ce qui explique l'écrasement de la courbe d'absorption dans le visible ; les doses de substances tannoïdes sont également plus faibles que dans le vin de carignan pur.

4^o) Discussion des résultats

Le vin de macération carbonique se distingue par une acidité initiale plus faible du fait de la disparition d'une partie de l'acide malique (et peut-être aussi d'une partie de l'acide tartrique comme d'autres expériences à confirmer semblent le montrer) par métabolisme intracellulaire ; cet abaissement d'acidité est moins net pour le 3^e essai car dans ce cas, le moût avait une acidité initiale plus basse (3,3 g/l au lieu de 4,2 g/l pour les deux autres essais), donc moins d'acides et le gain par transformation intracellulaire était nécessairement plus faible.

La fermentation malolactique s'y déclare plus rapidement ; ceci est dû à différentes causes : élévation du pH, absence de SO₂ et, en outre, cette technique est peut-être favorable au développement des bactéries malolactiques.

Le degré alcoolique du vin de macération carbonique est comparable à celui des deux autres techniques expérimentées (un peu plus faible que celui de la vendange éraflée mais un peu plus élevé que celui de la vendange entière foulée), ce qui confirme la nécessité d'un cuvage suffisamment long et d'un pressurage correct.

L'intensité colorante est plus faible sauf dans le cas de cépages blancs où elle est légèrement supérieure, cette intensité colorante est cependant comparable à celle des vins de goutte des deux autres techniques. Le taux de matières tannoïdes est particulièrement faible.

Le vin de raisins éraflés a une acidité plus élevée, un degré alcoolique légèrement supérieur (comme cela a été maintes fois souligné), et une intensité colorante un peu plus forte que les deux autres ; la teneur en matière tannoïdes globales est faible.

La fermentation des raisins entiers s'est déclarée rapidement et a été plus régulière que celle des raisins éraflés. D'une manière générale, la fermentation malolactique se déclare assez vite et les vins sont les intermédiaires de ceux des deux autres techniques sauf en ce qui concerne le taux des matières tannoïdes toujours assez élevé et le degré alcoolique un peu plus faible.

VI. — CONCLUSION

Les trois techniques de vinification étudiées présentent des différences caractéristiques entre elles.

Tout d'abord pendant la cuvaison, si la température des cuves des raisins entiers foulés et des raisins éraflés s'élève rapidement pour atteindre, certaines années, un degré incompatible avec une fermentation alcoolique normale et une bonne tenue ultérieure du vin, elle reste toujours suffisamment basse dans les cuves de macération carbonique. Ce fait est intéressant à souligner car pour une élaboration rationnelle des vins, il est nécessaire de contrôler la température de fermentation et par suite de posséder un système de réfrigération. Celui-ci est onéreux et sa rentabilité est discutable car il n'est pas utile chaque année.

On note ensuite des différences analytiques comparativement entre les vins de goutte et de presse de chaque technique, ainsi, les vins de presse des raisins entiers foulés et des raisins éraflés sont, comme cela l'a été plusieurs fois signalé, de densité élevée, riches en extrait sec, cendres, matières colorantes et tannoïdes, pauvres en alcool et en acides par rapport aux vins de goutte correspondants. Ces vins de presse montrent bien l'action de la macération des particules solides des raisins en milieu alcoolique.

Le vin de presse de la macération carbonique a une densité, un extrait sec, un taux de matières réductrices plus faibles, un peu moins de substances tannoïques et colorantes et un degré alcoolique nettement plus élevé que le vin de goutte correspondant. Ce vin de presse représente bien mieux le jus des grains conservés en atmosphère carbonique que le vin de goutte. Les mélanges des vins de goutte et de presse qui constituent généralement les produits commerciaux reflètent des caractères différents ; le vin de macération carbonique se distingue par une acidité totale plus faible, une couleur plus évoluée et une stabilisation biologique rapide.

Le vin de la vendange éraflée ayant un degré alcoolique un peu plus élevé, une acidité aussi plus forte, plus de couleur, moins d'extrait sec et de substances tannoïdes que le vin de vendange entière foulée. Celui-ci est intermédiaire entre les deux types précédents sauf pour les matières tannoïdes toujours plus élevées et le degré alcoolique un peu plus faible.

La dégustation de ces vins jeunes a été effectuée par un groupe de professionnels et de commerçants : les vins de vendange entière foulée ont été classés comme des Corbières classiques, de goût agréable, corsés, les vins de vendange éraflée sont un

peu plus durs que les précédents avec un peu d'astringence ; les vins de macération carbonique sont plus coulants, d'une couleur légèrement vieillie et d'un bouquet particulier, agréable.

D'une manière générale, les vins de macération carbonique atteignent plus tôt leur maturité biologique et gustative. Cette particularité s'avère intéressante car la conservation en cuve ou en fûts peut être considérablement raccourcie et les vins plus rapidement commercialisés.

Reçu pour publication en avril 1963.

SUMMARY

COMPARATIVE TRIALS IN RED WINE PRODUCTION

Three red wine making techniques were compared at the level of agricultural practice :

- crushed whole grapes ;
- crushed stripped grapes ;
- uncrushed whole grapes (carbonic maceration).

The temperature of fermentation in the vats of crushed whole and stripped grape vintages rose rapidly, while it always remained low enough in the carbonic maceration vats. The difference was at least 5°C. Press wines made from crushed whole grapes and crushed stripped grapes had high densities, were rich in extract, ash, colouring matter and tannoids, but poor in alcohol and acids in comparison with corresponding free run wines. Carbonic macerated so-called « press » wines, on the other hand, showed low density, extract and reducing substances, rather less colouring matter and tannoids and a higher alcohol content than the corresponding free run wines.

Carbonic maceration wines of low acid and tannin content reached their biological and flavour maturity more rapidly than the crushed whole grape and crushed stripped grape wines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BENARD P., JOURET C., 1962. Essais de vinification. Comparaison de trois techniques de vinification en rouge. *Vignes et Vins*, n° 108, 25-29, n° 109, 7-11.
- BENARD P., JOURET C., 1963. Le fer dans les vins rouges. *Vignes et Vins* (sous presse).
- DEIBNER L., BOUZIGUES H., 1952. Dosage électrophotométrique de traces de fer dans les vins à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Tech. Agr.*, **1**, 283-309.
- FLANZY M., 1935. Nouvelle méthode de vinification. *C. R. Ac. Agr.*, **21**, 935-938.
- FLANZY M., 1935. Sur la vinification des vins rouges. Nouvelle méthode de vinification. *Rev. Vit.*, **83**, 315-319 ; 325-329 ; 341-347.
- JAULMES P., 1951. *Analyse des vins*. Libr. Poulain, Montpellier.
- RIBÉREAU-GAYON J., MAURIE A., 1942. Les composés phénoliques du vin (matières colorantes et tannoïdes). *B. O. I. V.*, **15**, 60-76.
- SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. Agric.*, **11**, 203-208.

SIGNIFICATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE GERMINATION

B. de BATZ

Société d'Encouragement à la Culture des Orges de Brasserie, Maule (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

L'auteur étudie mathématiquement la précision à attendre des tests de germination pratiqués sur échantillons en laboratoire.

L'échantillon étant prélevé au hasard dans le lot de semences à étudier, le test fournit un résultat entaché d'une erreur aléatoire. L'application des lois de probabilité permet de préciser l'ordre de grandeur de cette erreur, c'est-à-dire de fixer les limites entre lesquelles la vraie valeur du pouvoir germinatif a une probabilité donnée de se situer. Cette méthode d'estimation par intervalle conduit à l'élaboration d'un plan d'échantillonnage tenant compte d'un contrat commercial possible, dont l'auteur envisage le modèle le plus général.

INTRODUCTION

Négociants et malteurs se trouvent dans l'impossibilité d'apprécier, à partir d'un seul examen visuel, une qualité essentielle d'un lot d'orge de brasserie — à savoir : le pourcentage de grains vivants — c'est-à-dire, de grains susceptibles, *a priori*, de germer. D'où, la mise au point de méthodes caractérisées par des conditions précises de température et d'humidité, ayant pour but de déclencher et d'accélérer les processus vitaux du grain, jusqu'à apparition d'un signe caractéristique permettant le classement en grains vivants et morts.

Les phénomènes de dormance, rendent difficile tout test de germination. Plus récemment, les études sur la sensibilité à l'eau, ont montré l'influence des conditions expérimentales sur la « réponse » de l'échantillon et, par suite, qu'aucune méthode de germination — du fait même des conditions qu'elle suppose — ne pouvait prétendre atteindre avec certitude et rapidement, le nombre de grains vivants contenus dans un échantillon.

Malgré le degré d'incertitude dû aux conditions expérimentales, malgré la durée très longue du processus, ces méthodes de germination restaient valables tant que

la détermination du nombre de grains vivants d'un échantillon ne pouvait être obtenue par un test n'exigeant aucune transformation provoquée du grain.

De telles méthodes existent aujourd'hui. L'emploi du « Vitascope », par exemple, en dehors même du fait qu'il fournit le résultat en quelques minutes, permet d'atteindre la valeur absolue du nombre de grains vivants contenus dans un échantillon, c'est-à-dire, d'estimer la valeur marchande réelle du lot.

En fait, vitascope et germination en laboratoire, ne mesurent pas les mêmes grandeurs. Le chiffre donné par le vitascope, correspond au nombre de grains vivants — c'est-à-dire, présentant les garanties suffisantes pour penser qu'ils étaient susceptibles de germer s'ils avaient été placés dans des conditions favorables.

Tout test de germination donne le pourcentage de grains d'un échantillon ayant réellement germé dans des conditions précises dont on ne peut dire si elles étaient très favorables ou non.

La signification d'un test de germination — qu'il serve à la détermination du pouvoir germinatif ou de l'énergie germinative — reste donc limitée. Le résultat, susceptible de guider le malteur dans le choix d'une méthode de trempe, ne saurait à lui seul caractériser le lot.

Il paraît donc souhaitable et raisonnable de généraliser — pour le commerce des grains en particulier — une méthode basée, comme celle du vitascope, sur la détermination du nombre de grains vivants.

Pourtant, la diversité des méthodes, les définitions souvent ambiguës, paraissent peser moins sur les résultats que les différences inéluctables dues au seul hasard de l'échantillonnage.

Le problème est donc à résoudre dans son ensemble. Il faut tout à la fois généraliser une méthode, donner une définition précise de la grandeur mesurée et prendre conscience du fait que l'échantillon, étant prélevé au hasard dans le lot, ne saurait fournir qu'un résultat aléatoire.

On pratique un test visant à déterminer le pourcentage *inconnu* de grains vivants contenus dans un lot d'orge de brasserie L . On prélève au hasard, un échantillon de n grains dans lequel l'expérience permet de dénombrer k grains vivants. L'usage veut que l'on retienne le rapport k/n pour caractériser la proportion p inconnue de grains vivant du lot L .

Si le fait de retenir k/n comme estimation de la proportion p inconnue est parfaitement valable, il faut souligner que le test ne constitue en aucune façon une mesure de p , et rien ne permet d'écrire que p est égal à k/n .

Le but de l'étude qui suit, est de dégager la signification de ce résultat expérimental, son caractère aléatoire, de montrer avec quelles restrictions doit être accueilli ce résultat, et sous quelles conditions doit être menée l'expérimentation.

ÉTUDE MATHÉMATIQUE

Soit un lot d'orge L , caractérisé par une proportion p *exactement connue* de grains vivants, et par conséquent, par une proportion $q = 1 - p$ de grains morts. On tire au *hasard* un grain dans ce lot. L'événement consistant à tirer un grain vivant a une probabilité de réalisation p . L'événement consistant à tirer un grain mort a

une probabilité q . Dire que p est plus grand que q signifie que l'on a, dans un prélèvement au hasard, « plus de chances » de tirer un grain vivant que de tirer un grain mort, mais rien ne permet de connaître à l'avance, avec certitude, la caractéristique du grain que l'on va tirer. Le résultat du tirage est aléatoire. Aussi, affirmer à l'avance que l'on va tirer un grain vivant, est une prédiction qui risque d'être fausse. Le risque que l'on a de se tromper, en émettant une telle proposition, est égal à la probabilité de l'événement consistant à ne pas tirer un grain vivant — c'est-à-dire ici à q , probabilité de tirer un grain mort.

Supposons maintenant que l'on prélève successivement au hasard n grains dans le lot L . On peut considérer — si n est faible par rapport au nombre total N de grains constitutifs du lot L — que la probabilité de tirer un grain vivant, au cours des n prélèvements successifs de un grain, reste constante et égale à p . Le résultat de chacun des n tirages indépendants étant aléatoire, le résultat global, c'est-à-dire, le nombre x de grains vivants que l'on constatera dans l'échantillon de taille n — est lui-même aléatoire.

L'analyse combinatoire et le calcul des probabilités montrent qu'à l'événement consistant à trouver k grains vivants dans un échantillon de taille n , prélevé au hasard dans un lot caractérisé par une proportion p de grains vivants, est attachée une probabilité de réalisation :

$$\text{Prob} \{ x = k \} = C_n^k p^k (1 - p)^{n-k}$$

Autrement dit, la probabilité de constater exactement k grains vivants dans un échantillon de taille n prélevé dans le lot L est : $C_n^k p^k (1 - p)^{n-k}$

avec $C_n = \frac{n!}{k!(n-k)!}$ et $n! = 1 \cdot 2 \cdot 3 \cdot \dots \cdot (n-2) (n-1) n$.

x est un nombre aléatoire qui suit la loi binomiale $B(n, p)$ d'espérance mathématique p et de variance npq .

Cette loi est dite *binomiale*, car les probabilités associées aux valeurs successives possibles de x sont obtenues symboliquement par le développement du binôme :

$$[(1 - p) + p]^n = (1 - p)^n + C_n^1 p (1 - p)^{n-1} + \dots + C_n^k p^k (1 - p)^{n-k} + \dots \\ \dots + C_n^{n-1} p^{n-1} (1 - p) + p^n.$$

On vérifie de même ainsi, que la somme des probabilités attachées aux valeurs successives possibles de x est égale à 1.

Le nombre aléatoire x pouvant prendre $(n + 1)$ valeurs $(0, 1, 2, \dots, n-1, n)$ et à chacune de ces valeurs étant associée la probabilité de réalisation $C_n^x p^x (1 - p)^{n-x}$ l'espérance mathématique est la somme des valeurs pondérées par les probabilités qui leur sont associées.

$$E(x) = \sum_{x=0}^{x=n} x C_n^x p^x (1 - p)^{n-x} = p.$$

La variance caractéristique de dispersion de la loi suivie par x est donnée ici par la relation :

$$V(x) = \sum_{x=0}^{x=n} [x - E(x)]^2 C_n^x p^x (1 - p)^{n-x} = npq.$$

La variance, carré de l'écart-type peut encore s'écrire sous la forme

$$V(x) = \sum_{x=0}^{x=n} x^2 C_n^x p^x (1-p)^{n-x} - [E(x)]^2 = npq.$$

plus favorable aux calculs.

Espérance mathématique et variance sont respectivement moment d'ordre 1 et moment centré d'ordre 2, relatifs à la loi suivie par la variable aléatoire x .

Dans la mesure où p est différent de 0 ou de 1, le nombre de grains vivants constatés dans un échantillon de taille n peut donc varier de 0 à n . Pour fort peu probable que ce soit, il n'est donc pas impossible de trouver, dans deux échantillons de taille n prélevés successivement dans le même lot L , une fois n grains vivants et l'autre fois 0.

Le calcul des expressions $C_n^k p^k (1-p)^{n-k}$ ($0 \leq k \leq n$) montre que, dès que n est suffisamment grand ($n > 20$) et p pas trop voisin de 0 ou de 1, la probabilité attachée à une valeur k quelconque de la variable aléatoire x est faible (au maximum 0,195 pour $p = 0,9$ et $n = 50$). Dans ces conditions, affirmer à l'avance que l'on va trouver exactement k grains vivants dans l'échantillon de taille n que l'on se propose de prélever dans le lot L , est une prédiction qui a un risque élevé d'être fausse. Le risque est ici égal à la probabilité que le nombre de grains vivants constaté, x , soit différent de k . C'est :

$$\alpha = 1 - \text{Prob}(x = k) = \text{Prob}(x \neq k).$$

Or, l'esprit se refuse à accepter et retenir une prédiction qui a « plus de chances » d'être fausse que vraie.

Au contraire, on tiendra pour presque certaine la réalisation d'un événement n'ayant qu'une probabilité faible de ne pas se produire. Si l'on peut raisonnablement accepter un risque de 5 ou 10 p. 100 de se tromper, il devient absurde de retenir une prédiction qui a 80 chances sur 100 d'être fausse. Aussi, si l'on veut augurer, avec un risque α faible de se tromper, du résultat du prélèvement d'un échantillon de taille n , dans le lot L , on est amené à limiter la précision de sa prédiction.

Affirmer à l'avance que l'on trouvera au moins k_1 grains vivants dans l'échantillon de taille n est une prédiction qui risque d'être fausse. Le risque est égal à la somme α_1 , des probabilités des événements consistant à trouver 0 ou 1 ou 2 ou 3 ou ... ou $(k_1 - 1)$ grains vivants dans l'échantillon, soit :

$$\alpha_1 = \sum_{x=0}^{x=k_1-1} C_n^x p^x (1-p)^{n-x}.$$

De même, affirmer à l'avance que l'on trouvera au plus k_2 grains vivants dans un échantillon de taille n prélevé dans le lot L , est une prédiction qui risque d'être fausse.

Le risque est ici égal à la somme α_2 des probabilités des événements consistant à trouver $(k_2 + 1)$ ou $(k_2 + 2)$ ou ... ou $(n - 1)$ ou n grains vivants dans l'échantillon, soit :

$$\alpha_2 = \sum_{x=k_2+1}^{x=n} C_n^x p^x (1-p)^{n-x}.$$

Ainsi, affirmer à l'avance que le nombre x de grains vivants, que l'on constatera dans un échantillon de taille n prélevé dans le lot L , sera compris entre k_1 et k_2 , est une prédiction qui risque d'être fautive. Le risque que l'on a de se tromper, en émettant une telle proposition, est égal à : $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$.

Nous dirons que (k_1, k_2) est l'*intervalle d'acceptation au risque* $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$ de la variable x , ce qui traduit également que la probabilité pour que le nombre x de grains vivants constaté dans l'échantillon soit compris dans l'intervalle (k_1, k_2) bornes comprises, est $(1 - \alpha)$ avec :

$$1 - \alpha = \sum_{x=k_1}^{x=k_2} C_n^x p^x (1 - p)^{n-x}$$

La loi binomiale étant une loi discrète (x ne peut prendre que des valeurs entières), il est en général impossible de définir un *intervalle d'acceptation aux risques exactement égaux* à α_1 et α_2 donnés à l'avance. On convient alors d'adopter, *bornes comprises*, l'intervalle défini par les valeurs k_1 et k_2 , telles que :

$$\begin{array}{ll} \text{Prob}(x < k_1) \leq \alpha_1 & \text{Prob}(x > k_2) \leq \alpha_2 \\ \text{Prob}(x \leq k_1) > \alpha_1 & \text{Prob}(x \geq k_2) > \alpha_2 \end{array}$$

— c'est-à-dire, que l'on fait en sorte que chaque risque soit au plus égal à la valeur fixée. Ainsi, le risque total est au plus égal à α .

L'un des deux risques α_1 ou α_2 peut être égalé à 0. On définit, dans ce cas, un intervalle d'acceptation *unilatéral*. Ce sera le cas, si l'on veut faire une prédiction portant, par exemple, sur le nombre minimum de grains vivants que l'on trouvera dans l'échantillon. L'intervalle d'acceptation unilatéral au risque α_1 de x est alors (k_1, n) , qui traduit que x a une probabilité égale à $(1 - \alpha_1)$ d'être supérieur ou égal à k_1 .

Suivant les nécessités ou le degré de confiance que l'on veut accorder à sa prédiction, le risque α est choisi égal à 1 p. 100, ou 2 p. 100, ou 5 p. 100, ou 10 p. 100... Dans le cas le plus général, on prend $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha/2$ conditions qui déterminent entièrement l'intervalle d'acceptation dans le cas d'un échantillon de taille n prélevé dans le lot L , caractérisé par une proportion p de grains vivants.

n étant fixé, pour les mêmes risques α_1 et α_2 donnés, correspond pour chaque valeur de p un intervalle d'acceptation de x au risque α . L'intervalle d'acceptation est une fonction de p .

Pour trouver l'intervalle d'acceptation aux risques α_1 et α_2 de la variable aléatoire x , il est nécessaire de connaître les probabilités attachées à chaque valeur de x de l'intervalle $(0, n)$ bornes comprises. Le calcul exact par la formule :

$$\text{Prob}(x = k) = C_n^k p^k (1 - p)^{n-k}$$

devient pratiquement impossible dès que n est grand.

On démontre cependant, que si p n'est pas trop voisin de 0, ou de 1, et si n est grand, on peut assimiler la loi binomiale et la loi normale de moyenne np et d'écart-type $\sigma = \sqrt{npq}$.

En effet, si $n \rightarrow \infty$, $B(n, p) \sim N(np, \sqrt{npq})$. (Le symbole $\sim$ que nous employons ici traduit qu'il s'agit d'une convergence en loi.)

De même, si p est très voisin de 1 — c'est-à-dire, si q est très petit — on montre que l'on peut assimiler — à condition que n soit grand — la loi binomiale $B(n, q)$ et la loi de POISSON de paramètre : $m = nq$.

Ces approximations — compte tenu des réserves faites sur p — sont excellentes dès que n dépasse 100.

Pour $p = 0,9$ et $n = 50$, les trois lois donnent déjà le même intervalle d'acceptation aux risques $\alpha_1 = \alpha_2 = 5$ p. 100.

La loi normale et la loi de POISSON étant tabulées parce qu'indépendantes du paramètre n , nous nous servirons de ces approximations pour le cas où l'échantillon est de taille supérieure à 100.

Ayant ainsi défini l'intervalle d'acceptation de x aux risques α_1 et α_2 , soulignons que — si petits que soient α_1 et α_2 — l'événement consistant à dénombrer dans l'échantillon de taille n un nombre de grains vivants inférieur à k_1 ou supérieur à k_2 n'est pas impossible. Cet événement, dont la probabilité peut être très faible — puisque égale à α — n'en est pas moins parfaitement réalisable. Il est même presque certain qu'il se réalisera, au cours d'une très longue série de prélèvements d'échantillons de taille n dans le lot L , le théorème de BERNOULLI énonçant que la fréquence relative d'un événement converge — en probabilité — vers la probabilité de cet événement, lorsque le nombre des épreuves croît indéfiniment.

Ce théorème — un des plus importants du calcul des probabilités — a d'intéressantes conséquences pratiques. Nous avons vu que prélever un échantillon de taille n c'était répéter n fois le prélèvement d'un grain. La probabilité de l'événement consistant à tirer un grain vivant restant constante et égale à p , le théorème de BERNOULLI permet de conclure que si l'on fait croître indéfiniment la taille de l'échantillon, la fréquence relative $f = x/n$ de grains vivants constatés, converge en probabilité vers p , proportion de grains vivants du lot L .

$$\text{Prob} \left(\left| \frac{x}{n} - p \right| > \eta \right) < \varepsilon \quad \text{avec } n > N(\eta, \varepsilon, p)$$

η et ε étant deux nombres positifs arbitrairement petits donnés à l'avance, on peut trouver N , tel que si la taille de l'échantillon est supérieure à N , on pourra affirmer — au risque au plus égal à ε de se tromper, que l'écart entre la fréquence relative, donnée expérimentale, et la valeur vraie p du pourcentage de grains vivants du lot, sera inférieur à η .

Si donc nous prenons comme variable aléatoire, non plus le nombre de grains vivants x , mais la fréquence relative $f = x/n$, nous pouvons conclure que pour n suffisamment grand ($n > N$), l'intervalle d'acceptation de f au risque ε — si petit soit-il — peut être rendu arbitrairement petit (inférieur à 2η).

Pour des risques α_1 et α_2 donnés, il est possible de réduire l'étendue de l'intervalle d'acceptation et, pour une étendue imposée de l'intervalle d'acceptation, il est possible de diminuer les risques α_1 et α_2 en augmentant la taille de l'échantillon.

La taille minimale de l'échantillon est entièrement déterminée par la donnée des risques α_1 et α_2 et de l'étendue de l'intervalle d'acceptation.

Ces résultats sont implicitement contenus dans l'énoncé de la loi suivie par la fréquence relative f . Puisque x suit la loi binomiale $B(n, p)$, $f = x/n$ suivra la loi discrète $1/n B(n, p)$ d'espérance mathématique p et de variance $\sigma^2 = pq/n$ qui tend vers 0 lorsque n tend vers l'infini.

L'intervalle d'acceptation de f aux risques α_1 et α_2 , se déduit de l'intervalle d'acceptation de x aux risques α_1 et α_2 par une homothétie de rapport $1/n$. Seule donc,

l'échelle de mesure change ; les probabilités attachées aux nombres aléatoires, x et x/n étant évidemment identiques.

L'intérêt de ce changement d'échelle réside dans le fait que, quelle que soit la taille de l'échantillon, f conserve une valeur finie, puisque x/n est nécessairement compris entre 0 et 1.

A partir d'un lot d'orge L , contenant une proportion p connue de grains vivants, nous avons abordé quelques aspects essentiels de la théorie de l'échantillonnage soulignant le caractère aléatoire du résultat fourni par l'échantillon et montrant qu'il était possible — moyennant l'acceptation d'un risque α de se tromper — de prédire entre quelles limites, relativement restreintes, pourrait varier la composition de l'échantillon. Utilisant le théorème de BERNOULLI, nous avons vu que l'augmentation de la taille de l'échantillon permettait, à la fois, de diminuer le risque et d'augmenter la précision de sa prédiction.

Le problème qui se pose dans tout laboratoire est, en réalité, inverse : Nous connaissons, par l'expérience, le nombre de grains vivants k_0 contenus dans un échantillon de taille n prélevé dans le lot L_0 où la proportion de grains vivants est *totalelement inconnue*.

Or, quelle que soit la proportion p (différente de 0 ou de 1) de grains vivants d'un lot, l'événement consistant à prélever un échantillon de taille n contenant exactement k_0 grains vivants est parfaitement réalisable. Aucune conclusion ne semble donc pouvoir être tirée quant à la valeur de p caractérisant le lot L_0 . La seule affirmation que l'on puisse faire sans risque de se tromper est que le lot contenait au moins k_0 grains vivants et $(n - k_0)$ grains mort — c'est-à-dire que si N est le nombre total de grains du lot :

$$\frac{k_0}{N} \leq p \leq 1 - \frac{n - k_0}{N}.$$

Ce serait là une information qui serait satisfaisante, si n , taille de l'échantillon, était voisin de N — ce qu'il est absurde de concevoir.

Cependant, le théorème de BERNOULLI énonce que la fréquence relative, converge en probabilité vers p lorsque la taille de l'échantillon croît indéfiniment. Pour une taille n suffisamment grande de l'échantillon $f = k/n$ est probablement *assez voisin* de p . Nous dirons alors que f_0 — résultat expérimental — est une *estimation* de p_0 ou que la fréquence relative est un *estimateur* de la proportion p_0 vraie de grains vivants du lot L_0 .

Mais, le résultat de l'expérimentation, nombre x de grains vivants constaté dans un échantillon de taille n prélevé dans le lot L , est *aléatoire*. L'estimateur $f = x/n$ est une fonction du résultat de l'observation : de ce fait, il fournit de p une *estimation nécessairement aléatoire*.

La théorie de l'estimation permet de vérifier que la fréquence relative $f = x/n$ est un estimateur de p qui possède toutes les qualités d'un bon estimateur :

— f est un estimateur *convergent* de p — c'est-à-dire qu'il converge en probabilité vers p lorsque la taille de l'échantillon croît indéfiniment — ce qu'a déjà permis de montrer le théorème de BERNOULLI.

— f est un estimateur *sans biais* de p . En effet, quelle que soit n , taille de l'échantillon, l'espérance mathématique de f est égale à p :

$$E(f) = \sum_{x=0}^{x=n} \frac{x}{n} C_n^x p^x (1-p)^{n-x} = p.$$

— On démontre encore que f , estimateur *absolument correct*, est un estimateur *exhaustif* — c'est-à-dire qu'il épuise toute l'information et résume l'échantillon.

— f est un estimateur de p qui possède la variance minimale donnée par l'inégalité de FRECHET ; — c'est donc l'estimateur le plus *efficace* — c'est-à-dire, celui qui donne de p l'estimation comportant l'erreur aléatoire la plus faible. L'inégalité de FRECHET, exprime qu'il est impossible — à partir d'un échantillon — d'estimer sans erreur aléatoire un paramètre inconnu, et fixe la variance minimale de l'estimateur.

Ainsi, à partir d'un échantillon de taille n dans lequel on a dénombré k grains vivants, la théorie invite à retenir k/n comme *meilleure estimation* de la proportion p inconnue du lot d'où est issu l'échantillon. C'est à défaut d'information supplémentaire, et parce que le but même de la prise d'échantillon est de permettre de caractériser le lot, que l'on retient ce résultat en première approximation, bien que rien ne permette — étant donné le caractère aléatoire du résultat de l'échantillonnage — d'écrire que p , valeur vraie du pourcentage de grains vivants, est égal à f .

S'il est évidemment intéressant de pouvoir estimer p par le nombre $f = k/n$ il est souhaitable, sinon nécessaire, de connaître l'ordre de grandeur de l'erreur aléatoire qui affecte cette estimation — c'est-à-dire, de savoir avec quelle précision est estimé p .

L'estimation par intervalle répond à ce besoin. On fera une estimation par intervalle — l'*intervalle de confiance* — auquel sera liée une probabilité donnée à l'avance de recouvrir la vraie valeur p .

La loi de probabilité suivie par la fréquence relative f est la loi discrète $1/n B(n, p)$. Nous avons défini pour chaque valeur de p l'intervalle d'acceptation de f au risque au plus égal à α , comme l'ensemble des valeurs possibles de l'intervalle (f_1, f_2) tel que :

$$\text{Prob}(f < f_1) \leq \alpha_1$$

$$\text{Prob}(f > f_2) \leq \alpha_2$$

Nous dirons que deux valeurs numériques f_0 et p_0 sont en *correspondance*, ou *associées*, si f_0 appartient à l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_0$. L'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_0$ est ainsi l'ensemble des valeurs de f associées à p_0 .

Parallèlement, nous appellerons *intervalle de confiance* de p pour $f = f_0$ l'ensemble des valeurs de p associées à f_0 . L'intervalle de confiance de p pour $f = f_0$ est donc l'ensemble des valeurs de p pour lesquelles f_0 est dans l'intervalle d'acceptation de f .

Cet intervalle de confiance de p est une fonction de f , résultat aléatoire ; par suite, l'intervalle de confiance est un intervalle aléatoire.

Supposons un lot L_0 caractérisé par une proportion p_0 de grains vivants. Soit f_0 l'estimateur obtenu à partir d'un échantillon prélevé dans ce lot. L'intervalle de confiance de p calculé à partir de f_0 contiendra p_0 si p_0 et f_0 sont en correspondance — c'est-à-dire, si f_0 est dans l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_0$. Or, par définition même de l'intervalle d'acceptation, la probabilité que f_0 soit dans l'intervalle d'acceptation de f , lorsque $p = p_0$, est $(1 - \alpha)$. Il y a donc une *probabilité* égale à $(1 - \alpha)$ que l'intervalle de confiance de p recouvre ou contienne la vraie valeur. On définit ainsi l'intervalle de confiance au risque α ou au niveau de signification $(1 - \alpha)$.

C'est-à-dire que si l'on prélève de très nombreux échantillons dans le lot L_0 et qu'au vu de chacun d'eux on définit un intervalle de confiance au risque α de p , en vertu du théorème de BERNOULLI, ou pourra conclure qu'une proportion des échantillons, probablement voisine de $(1 - \alpha)$ fournira un intervalle de confiance qui recouvrira la vraie valeur p_0 .

L'intervalle de confiance a une probabilité α de ne pas recouvrir la vraie valeur.

L'intervalle de confiance sera à droite de la vraie valeur — c'est-à-dire, fournira un ensemble de valeurs supérieures à la vraie valeur p_0 si f_0 est supérieure à la borne f_2 de l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_0$. Or, la probabilité que f soit supérieure à f_2 si $p = p_0$ est α_2 .

L'intervalle de confiance sera à gauche de la vraie valeur — c'est-à-dire, fournira un ensemble de valeurs inférieures à la vraie valeur p_0 si f_0 est inférieure à la borne f_1 de l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_0$. La probabilité qu'il en soit ainsi est α_1 .

On peut ainsi définir l'intervalle de confiance *unilatéral* ($0, p_2$) qui a une probabilité $1 - \alpha$ de recouvrir la vraie valeur et l'intervalle de confiance *unilatéral* ($p_1, 1$) qui a une probabilité $1 - \alpha_2$ de recouvrir la vraie valeur.

Soit (p_1, p_2) l'intervalle de confiance au risque α de p pour $f = k/n \cdot p_1$, borne inférieure de l'intervalle, est tel que k/n est borne supérieure de l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_1$.

p_2 , borne supérieure à l'intervalle de confiance de p , est tel que k/n est borne inférieure de l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_2$.

Par suite, pour déterminer l'intervalle de confiance de p , dans le cas où l'expérience a permis de dénombrer k grains vivants dans l'échantillon de taille n , il faut résoudre le système d'équations en p :

$$\sum_{x=0}^{x=k-1} C_n^x p^x (1-p)^{n-x} = \alpha_1 \text{ qui donne } p_2$$

$$\sum_{x=k+1}^x C_n^x p^x (1-p)^{n-x} = \alpha_2 \text{ qui donne } p_1.$$

Si n est grand, la résolution rigoureuse d'un tel système, est pratiquement impossible. Nous ferons donc appel aux approximations fournies par la loi normale et la loi de POISSON, pour établir les tables et abaquages, donnant directement l'intervalle de confiance à adopter pour p suivant le résultat de l'échantillonnage.

L'intervalle de confiance de p , compte tenu du caractère aléatoire de l'échantillonnage, des moyens d'investigation mis en œuvre, satisfait, dans toute la mesure du possible, notre curiosité.

Cependant — le plus souvent — le test est pratiqué dans le but de vérifier que la qualité d'un lot commercialisé, est bien conforme au contrat passé entre vendeur et acheteur. C'est bien le cas, lorsqu'un acheteur veut vérifier que le lot qui lui est livré contient bien une proportion de grains vivants p égale à p_0 fixée par le contrat.

Il prélève donc un échantillon de taille n qui fournit de p une estimation $f_0 = k_0/n$. Si l'hypothèse $p = p_0$ est vraie, il y a une probabilité $1 - \alpha$ que l'estimation de p obtenue à partir de l'échantillon, soit contenue dans l'intervalle d'acceptation au risque α de f lorsque $p = p_0$.

On conviendra donc de ne pas refuser l'hypothèse $p = p_0$ si f_0 est dans l'intervalle d'acceptation de f au risque α lorsque $p = p_0$ ou encore, on dira que l'hypothèse $p = p_0$ est acceptable au risque α si f_0 est dans l'intervalle d'acceptation de f au risque α pour $p = p_0$. On conviendra, au contraire, de refuser au risque α l'hypothèse $p = p_0$ si f_0 n'est pas dans l'intervalle d'acceptation de f pour $p = p_0$.

En réalité, le fait que p soit supérieur à p_0 n'a pas de conséquence fâcheuse.

On conviendra donc de refuser au risque α_1 , l'hypothèse $p \geq p_0$ si f_0 n'est pas l'intervalle d'acceptation unilatéral de f au risque α_1 pour $p = p_0$. Il reviendrait au même de dire que l'on accepterait au risque α_1 l'hypothèse $p \geq p_0$ si l'intervalle de confiance unilatéral $(0, p_2)$ de p calculé à partir de f_0 recouvrait la valeur p_0 et l'on conviendrait de refuser au risque α_1 l'hypothèse $p \geq p_0$, si l'intervalle de confiance unilatéral de p $(0, p_2)$ calculé à partir de f_0 ne recouvrait pas p_0 .

Une procédure plus souple peut être envisagée. On définit pour $p = p_0$ l'intervalle d'acceptation unilatéral de f , au risque 0,05 par exemple, et l'intervalle d'acceptation unilatéral de f au risque 0,01 par exemple — et l'on conviendra alors :

- d'accepter l'hypothèse $p \geq p_0$ si f_0 est dans l'intervalle d'acceptation unilatéral de f au risque 0,05,
- de rejeter l'hypothèse si f_0 est extérieur à l'intervalle d'acceptation unilatéral de f au risque 0,01,
- de recommencer l'expérience si f_0 est extérieur au premier intervalle, mais intérieur au second.

Mais, l'échantillon étant *aléatoire*, la décision prise peut l'être à tort. On peut être amené à refuser l'hypothèse $p \geq p_0$ alors même qu'elle est vraie. C'est le *risque de première espèce* égal à α_1 si l'on a fait le choix d'un intervalle unilatéral. En effet, la probabilité que f_0 n'appartienne pas pour $p = p_0$ à l'intervalle d'acceptation unilatéral de f au risque α_1 est, par définition même, α_1 .

Mais on peut, d'autre part, être conduit à *accepter l'hypothèse* $p \geq p_0$ alors même qu'elle est *fausse*. C'est le risque β ou *risque de deuxième espèce* qui dépend de la vraie valeur p_1 de p , de p_0 , du choix de α_1 et de la taille de l'échantillon.

Le risque β est égal à la probabilité que f_0 soit dans l'intervalle d'acceptation au risque α_1 de f pour $p = p_0$ alors que $p = p_1$. C'est également la probabilité qu'à l'intervalle de confiance de p calculé à partir de f_0 de recouvrir p_0 alors que $p = p_1$.

La courbe d'efficacité d'un test est la courbe représentative de β en fonction de p ($\alpha_1, \alpha_2, p_0, n$ étant fixés).

Le risque de première espèce α est le risque du fournisseur de se voir refuser un lot, alors même qu'il est caractérisé par une proportion de grains vivants égale à p_0 .

Le risque β , ou de deuxième espèce, est le risque du client d'accepter un lot de qualité p_1 inférieure à p_0 fixée par le contrat.

Quelle que soit la taille de l'échantillon, ces deux risques existent et un contrat commercial doit prévoir les clauses spéciales, sur lesquelles acheteur et vendeur sont d'accord — c'est-à-dire, fixer les valeurs p_0 et p_1 et les risques α et β qu'acceptent de courir les deux parties.

Une base raisonnable d'accord consisterait à fixer à 95 p. 100, le pourcentage de grains vivants d'un lot d'orge de brasserie de qualité marchande moyenne : le vendeur acceptant un risque au plus égal à 5 p. 100 de se voir refuser un lot caractérisé par une proportion de grains vivants égale à 95 p. 100, l'acheteur admettant de courir un risque au plus égal à 5 p. 100 d'accepter un lot où la proportion de grains vivants est de 90 p. 100. Cette valeur $p_1 = 90$ p. 100 — que nous appellerons *qualité inférieure limite*, correspond au pourcentage minimum de grains vivants caractérisant un lot pouvant être à la rigueur utilisé en malterie.

Les données sont ici :

$$\begin{array}{ll} p_0 = 0,95 & \alpha = 0,05 \\ p_1 = 0,90 & \beta = 0,05 \end{array}$$

- ce qui traduit qu'un lot contenant une proportion de grains vivants supérieure à 95 p. 100 a une probabilité supérieure à 0,95 d'être accepté,
- un lot de qualité inférieure à 90 p. 100 a une probabilité inférieure à 0,05 d'être accepté.

Le plan d'expérience est entièrement déterminé par ces données qui imposent la taille minimale de l'échantillon.

Soit $f_1 = k_1/n$ la limite inférieure de l'intervalle d'acceptation unilatéral de f au risque α_1 lorsque $p = p_0$:

$$\alpha_1 = \text{Prob (si } p_0) (f < f_1) = \sum_{x=0}^{x=k_1-1} C_n^x p_0^x (1 - p_0)^{n-x}.$$

Soit β la probabilité que f soit supérieur ou égal à $f_1 = k_1/n$ dans le cas où $p = p_1$.

$$\beta = \text{Prob (si } p_1) (f \geq f_1) = \sum_{x=k_1}^{x=n} C_n^x p_1^x (1 - p_1)^{n-x}.$$

Si $p = p_0$ l'estimation de p fournie par l'échantillon a une probabilité α_1 , d'être inférieure à f_1 , — c'est-à-dire de conduire au rejet de l'hypothèse $p \geq p_0$ alors même qu'elle est vraie.

Si $p = p_1$, l'estimation de p fournie par l'échantillon a une probabilité β d'être supérieure ou égale à f_1 . Or, toutes les valeurs de f , supérieures ou égales à f_1 , rendent acceptables l'hypothèse $p \geq p_0$; il y a donc un risque β d'accepter l'hypothèse $p \geq p_0$ alors que $p = p_1 < p_0$.

La résolution du système d'équations à deux inconnues k_1 et n :

$$1 - \alpha_1 \geq \sum_{x=k_1}^{x=n} C_n^x p_0^x (1 - p_0)^{n-x}$$

$$\beta \leq \sum_{x=k_1}^{x=n} C_n^x p_1^x (1 - p_1)^{n-x}$$

donne donc, à la fois, la taille de l'échantillon nécessaire et le « nombre critique » k_1 , tel que si le nombre de grains vivants constatés dans l'échantillon est inférieur à k_1 , le lot sera refusé.

Nous utiliserons, pour résoudre ce système, les approximations fournies par la loi normale et la loi POISSON et donnerons les valeurs de n et de k_1 , relatives à quelques combinaisons simples, où varient p_0 , p_1 , α et β .

L'étude du test de vérification d'hypothèse conduit tout naturellement à l'élaboration d'un contrat commercial type. Tel que nous l'avons défini par l'exemple donné plus haut, il peut paraître trop rigide et peu adapté aux traditions commerciales. Il est cependant parfaitement possible d'envisager des contrats ne conduisant pas au refus pur et simple d'un lot, au vu d'un seul échantillonnage.

La décision pouvant rester en suspens, on attendrait alors confirmation ou infirmation — par un deuxième échantillonnage — du premier résultat. Ou bien, l'on conviendrait de poursuivre l'expérimentation, jusqu'à ce que la vraie valeur du pourcentage de grains vivants du lot soit estimée avec une précision suffisante pour permettre une décision assortie de pénalités dans le cas où p est inférieur à p_0 .

On peut en effet supposer, qu'un premier échantillonnage a conduit à un résultat

défavorable — c'est-à-dire, à constater un nombre de grains vivants k'_1 inférieur au nombre critique k_1 .

— Le vendeur pouvant logiquement préjuger de la qualité du lot, soit par une expérimentation préliminaire, soit par la confiance dont il peut honorer ses fournisseurs habituels.

— Le résultat de l'échantillonnage étant aléatoire.

— Le refus du lot se faisant au préjudice du vendeur, celui-ci doit pouvoir demander une contre-expertise — c'est-à-dire que, convaincu que l'échantillonnage lui a été défavorable, il entend poursuivre l'expérimentation.

Il semble que dans ce cas particulier le droit à ce recours soit justifié et que, par conséquent, le contrat commercial doive prévoir les modalités d'application d'un deuxième plan d'échantillonnage, destiné à améliorer la connaissance du lot à étudier.

Il ne s'agit en aucun cas, d'annuler le résultat fourni par le premier échantillon au bénéfice du second, car, si le vendeur peut arguer d'un premier résultat défavorable, l'acheteur — pour les mêmes raisons — pourra prétendre que le deuxième échantillon n'est pas représentatif de la qualité défectueuse du lot.

Poursuivre l'expérimentation n'est pas la recommencer et doit s'interpréter comme une application du théorème de BERNOULLI : l'accroissement de la taille de l'échantillon entraînant la convergence, en probabilité, de la fréquence relative vers le pourcentage réel de grains vivants du lot.

Le premier échantillonnage représenterait donc dans l'expérimentation, une étape permettant un comptage provisoire, un sous-total. L'expérimentation est poursuivie dans le but d'accroître la taille de l'échantillon, jusqu'à obtenir un intervalle de confiance caractérisant le lot, avec la précision suffisante permettant de prendre une décision éventuellement assortie de réfections.

Compte tenu du résultat du premier échantillonnage, l'acheteur est fondé à penser — tout en restant persuadé de la bonne foi du vendeur — que le lot proposé à l'expérimentation n'a pas, pour une cause ignorée, la qualité que voudrait lui voir reconnaître le vendeur. Cependant plutôt que de refuser purement et simplement un lot qui présenterait par ailleurs, de bons critères de qualité (calibrage, poids spécifique, teneur en protéine, humidité ...), l'acheteur sera d'accord pour tenter de définir, avec le maximum de précision, le pourcentage de grains vivants du lot, attendant d'un échantillonnage complémentaire, une possibilité nouvelle d'acceptation, mais ne renonçant pas pour autant, aux clauses du contrat.

La qualité inférieure-limite p_1 ayant été définie comme le pourcentage minimum de grains vivants d'un lot destiné à la malterie, l'acheteur ne saurait renoncer à l'application stricte des clauses contractuelles fixant p_1 et le risque β et maintiendrait son refus, si l'expérimentation complémentaire venait confirmer le résultat défavorable déjà acquis. Cependant, il reste prêt à accepter le lot, s'il s'avère que sa qualité, quoique très probablement inférieure à p_0 est tout de même supérieure à p_1 .

Dans la mesure où l'échantillonnage permet d'affirmer au risque α de se tromper, que la proportion p de grains vivants du lot est inférieure à p_0 et au risque β de se tromper, que p est supérieure à p_1 , l'acheteur acceptera le lot, mais sera en droit d'exiger une indemnité proportionnelle à la différence ($p_0 - p$).

La reconnaissance du droit à poursuivre l'expérimentation, du fait des possibilités nouvelles, mais conditionnelles d'acceptation du lot qu'elle offre, suppose que les conditions d'attribution des indemnités sont clairement stipulées dans le contrat.

Lors du premier échantillonnage, la taille n de l'échantillon et le nombre critique k_1 sont solutions des équations :

$$\sum_{x=k_1}^{x=n} C_n^x p_0^x (1 - p_0)^{n-x} = 1 - \alpha$$

$$\sum_{x=k_1}^{x=n} C_n^x p_1^x (1 - p_1)^{n-x} = \beta.$$

Le contrat doit fixer tout d'abord, les conditions dans lesquelles pourra s'exercer le droit à expérimentation complémentaire.

— Si le nombre x de grains vivants trouvés dans l'échantillon est supérieur ou égal à k_1 le lot est accepté.

— Si le nombre x de grains vivants trouvés dans l'échantillon est inférieur à k_1 mais supérieur ou égal à k_2 , l'expérimentation est poursuivie.

— Si le nombre x de grains vivants trouvés dans l'échantillon est inférieur à k_2 le lot est refusé.

k_2 peut être pris égal à np_1 — c'est-à-dire, que l'estimation ponctuelle obtenue à partir du premier échantillon doit être supérieure ou égale à p_1 pour pouvoir donner lieu à la poursuite de l'expérimentation.

Toute autre limite peut être adoptée pour k_2 : il semble cependant que le choix de $k_2 = np_1$ réponde à une nécessité psychologique et qu'à la fois, il donne au vendeur assez de garanties tout en sauvegardant l'aspect économique du problème. Il serait en effet vain de vouloir entreprendre une expérimentation complémentaire, qui a de très grandes chances de confirmer — voire d'aggraver — le résultat fourni par le premier échantillon.

Dans le cas où l'expérimentation est poursuivie, il peut en résulter trois types de décision :

- Acceptation du lot,
- Acceptation du lot assortie d'indemnités,
- Refus du lot.

Seule l'acceptation du lot assortie d'indemnité, pose un problème dont la solution fournira tout à la fois, la taille de l'échantillon complémentaire à prélever et le nombre critique.

Pour que l'acceptation soit assortie de refactions, il faut mettre en évidence le fait que le pourcentage réel p de grains vivant du lot, est — au risque α de se tromper — inférieur à p_0 (tout en pouvant affirmer — au risque β de se tromper — qu'il est supérieur à p_1).

On est donc amené à tester que p est supérieur à p_1 (risque β) et inférieur ou égal à $p'_0 = (p_0 - 1 \text{ p. } 100)$ ou $p'_0 = (p_0 - 2 \text{ p. } 100)$ ou $p'_0 = (p_0 - 3 \text{ p. } 100)$.. (risque α).

n' nombre total de grains à prélever et k' nombre critique total, sont solutions du système d'équation :

$$\sum_{x=k'}^{x=n'} C_{n'}^x p_0'^x (1 - p_0)^{n'-x} = 1 - \alpha$$

$$\sum_{x=k'}^{x=n'} C_{n'}^x p_1^x (1 - p_1)^{n'-x} = \beta.$$

La réduction de l'intervalle de confiance de p entraînant des prises d'échantillons importantes, il faudra être prudent sur le choix de la valeur de p'_0 à adopter.

Les clauses d'un contrat ont, par exemple, fixé :

$$\begin{array}{ll} p_0 = 95 \% & \alpha = 0,05 (5 \%) \\ p_1 = 90 \% & \beta = 0,05 (5 \%) \end{array}$$

la taille de l'échantillon à prélever est $n = 330$, le nombre critique $k_1 = 305$; — supposons que l'expérimentation conduise à dénombrer 298 grains vivants : le lot ne peut être accepté. Toutefois, 298 est supérieur à $k_2 = np_1 = 297$. Le droit pour le vendeur de demander la poursuite de l'expérimentation peut et doit jouer.

Si nous considérons l'abaque $n = 300$, $\alpha_1 = 5$ p. 100, $\alpha_2 = 5$ p. 100, nous constatons que l'intervalle de confiance de p obtenu pour $x = 270 = np_1$ a pour limites 86,6 et 92,8.

Cet intervalle de confiance doit être assez voisin de celui obtenu pour $n = 330$ et $x = 298$ — il serait donc logique de choisir pour p'_0 la valeur 93 p. 100 et de tester que p est probablement inférieur à 93 p. 100 et supérieur à 90 p. 100.

Si nous choisissons $p'_0 = 92$ p. 100, le dernier tableau, ligne 4, nous donne directement la taille de l'échantillon total à prélever et le nombre critique k' :

$$\begin{array}{l} n' = 2\ 324 \\ k' = 2\ 114 \end{array}$$

il faudra donc prélever encore 1 994 grains — l'acceptation du lot n'ayant lieu que si le 2^e échantillon permet de dénombrer au moins 1 816 grains vivants. ($1\ 816 + 298 = 2\ 114$).

Si le nombre de grains vivants constatés dans l'échantillon était inférieur à 1 816, le lot serait refusé.

Si l'on avait choisi comme limite $p_0 = 93$ p. 100, on aurait trouvé :

$$\begin{array}{l} n' = 1\ 000 \\ k' = 916 \end{array}$$

— c'est-à-dire que, compte tenu du premier échantillonnage, il aurait fallu prélever encore 670 grains et le lot aurait été accepté si l'on avait pu, au total, dénombrer au moins 916 grains vivants — soit 618 grains vivants au deuxième prélèvement.

Si donc, ayant choisi comme limite $p'_0 = 93$ p. 100, on trouve un nombre total de grains vivants exactement égal à 916, on pourra accepter le lot et affirmer — au risque au plus égal à α — que le pourcentage de grains vivants du lot est plus au égal à 93 p. 100. La refaction dont devra bénéficier l'acheteur, sera donc proportionnelle à $95 - 93 = 2$.

En général, le nombre total k de grains vivants constatés, sera inférieur ou supérieur à k' . Si il est inférieur à k' le lot est refusé. Si le nombre total de grains vivants constatés est supérieur à k' , on ne pourra pas affirmer que le pourcentage de grains vivant du lot, est au plus égal à p'_0 (risque α).

On cherchera donc, à l'aide de l'approximation normale ou de la loi de POISSON, la valeur p_2 telle que :

$$\sum_{x=n'}^{x=k} C_n^x p_2^x (1 - p_2)^{n-x} = 1 - \alpha.$$

On pourra alors affirmer — au risque au plus égal à α — que le pourcentage de grains vivants du lot est au plus égal à p_2 .

Reprenant l'exemple précédent, nous supposons que le nombre total de grains constatés sur les 1 000 grains prélevés est : 921.

Nous devons résoudre l'équation en p :

$$\sum_{x=921}^{x=1\,000} C_{1000}^x p^x (1-p)^{1\,000-x} = 0,95$$

dont une solution approchée est $p_2 = 93,5$.

On peut donc affirmer — au risque au plus égal à 5 p. 100 de se tromper — que le pourcentage de grains vivants du lot est au plus égal à 93,5 p. 100, donc inférieur à 94 p. 100.

La refaction sera donc calculée sur la base $p < 94$ p. 100, si l'on convient de prendre 1 p. 100 comme unité.

Le choix de la valeur p'_0 et, par suite, du nombre total de grains à prélever, dépend de la précision que l'on attend de l'estimation.

Il est à remarquer que vendeur et acheteur, ont intérêt à obtenir une estimation précise : l'acheteur y verra un moyen d'obtenir une refaction plus importante, le vendeur une plus grande garantie de voir accepter un lot dont le pourcentage de grains vivants est voisin de p_1 . Toutefois, l'on ne saurait augmenter indéfiniment la taille de l'échantillon et finalement, vendeur et acheteur, devront consulter les laboratoires d'analyse pour fixer, d'un commun accord, les limites du possible.

CONCLUSION

Au terme de cette étude, apparaît une réalité avec laquelle il est malaisé de composer : les résultats obtenus à partir d'une détermination de pourcentage de grains vivants, de pouvoir germinatif, de pureté variétale... sont aléatoires et ne peuvent être considérés que comme des estimations — plus ou moins précises — de la valeur *vraie* caractérisant le lot.

Une vérité nous échappe, une vérité à laquelle aucun perfectionnement technique des méthodes actuelles d'investigation ne permettra d'atteindre. On ne peut, sans erreur aléatoire, estimer un paramètre inconnu à partir du résultat fourni par un échantillon. Seule, une augmentation démesurée de la taille de l'échantillon, permettrait d'approcher d'aussi près que l'on voudrait, en probabilité, la vraie valeur. L'application du théorème de BERNOULLI en ce domaine, reste, aujourd'hui encore, utopique.

Pourtant, la méthode d'estimation par intervalle que nous avons exposée, est un compromis satisfaisant. Cette méthode conduit à un processus expérimental, tenant compte du contrat commercial où seront stipulés — avec précision — les normes de qualité et les risques que partageront acheteurs et vendeurs.

De telles clauses supposent une adhésion des deux parties aux principes d'échantillonnage, et une acceptation raisonnée du processus expérimental auquel ils conduisent.

L'échantillonnage doit être fait au hasard. C'est, à la fois, la meilleure méthode pour obtenir un échantillon représentatif et une condition absolument indispensable pour assurer l'application rigoureuse des lois de probabilité. On conviendra donc de constituer, par des prélèvements très nombreux, effectués au hasard, un grand échantillon (quelques kilos) réellement représentatif du lot.

Cet échantillon, correctement homogénéisé, sera agréé par l'acheteur et le vendeur, et c'est à partir de cette seule source que seront prélevés les grains servant à l'expérimentation en laboratoire.

Reçu pour publication en septembre 1962.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les professeurs du Centre de Formation aux applications industrielles de la Statistique, M^{lle} MARQUET — professeur à la Faculté de Lille — de l'orientation qu'ils ont donnée à notre étude, des conseils et de l'aide qu'ils nous ont apportés pour la rédaction de ce travail.

SUMMARY

SIGNIFICANCE AND INTERPRETATION OF GERMINATION TRIALS

The result of a germination trial carried out in the laboratory was a function of the sampling chance.

If the germinating capacity of a batch of seed was known exactly, the theory of probability would enable one to predict with a risk (α) of being in error, the limits between which the result of a trial carried out on a sample of size (n) would fall.

But the actual problem posed in the laboratory was the inverse of this. Experiment gave the percentage of seeds which had germinated in a sample (n) which had been drawn at random from a batch, the germinative power (P) of which was entirely unknown. The percentage of germinating seeds present in the sample was an indicator of the germinative power (P) of the batch.

Applying the laws of probability to this indicator enabled one to define a confidence interval which had a predetermined probability of containing the true value of the P sought. Tables were available for reading off directly the confidence intervals as functions of the experimental results obtained and the degree of confidence chosen.

From this rational method of estimation by intervals, a sampling technique had resulted which was adapted to the conditions imposed by the control, or to the particular clauses of a commercial contract of which the most general form was indicated.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- FISHER R. A., 1957. *Les méthodes statistiques appliquées à la recherche scientifique*. Presses universitaires, Paris.
 DARMOIS G. *Statistiques mathématiques*. Doin, Paris.
 VESSEREAU A., 1948. *Méthodes statistiques en biologie et en agronomie*. Baillière, Paris.
 GIRAUD M., 1960. *Calcul des probabilités en vue des applications*. Dunod, Paris.
 MOTHES J., 1962. *Prévisions et décisions statistiques dans l'entreprise*. Dunod, Paris.

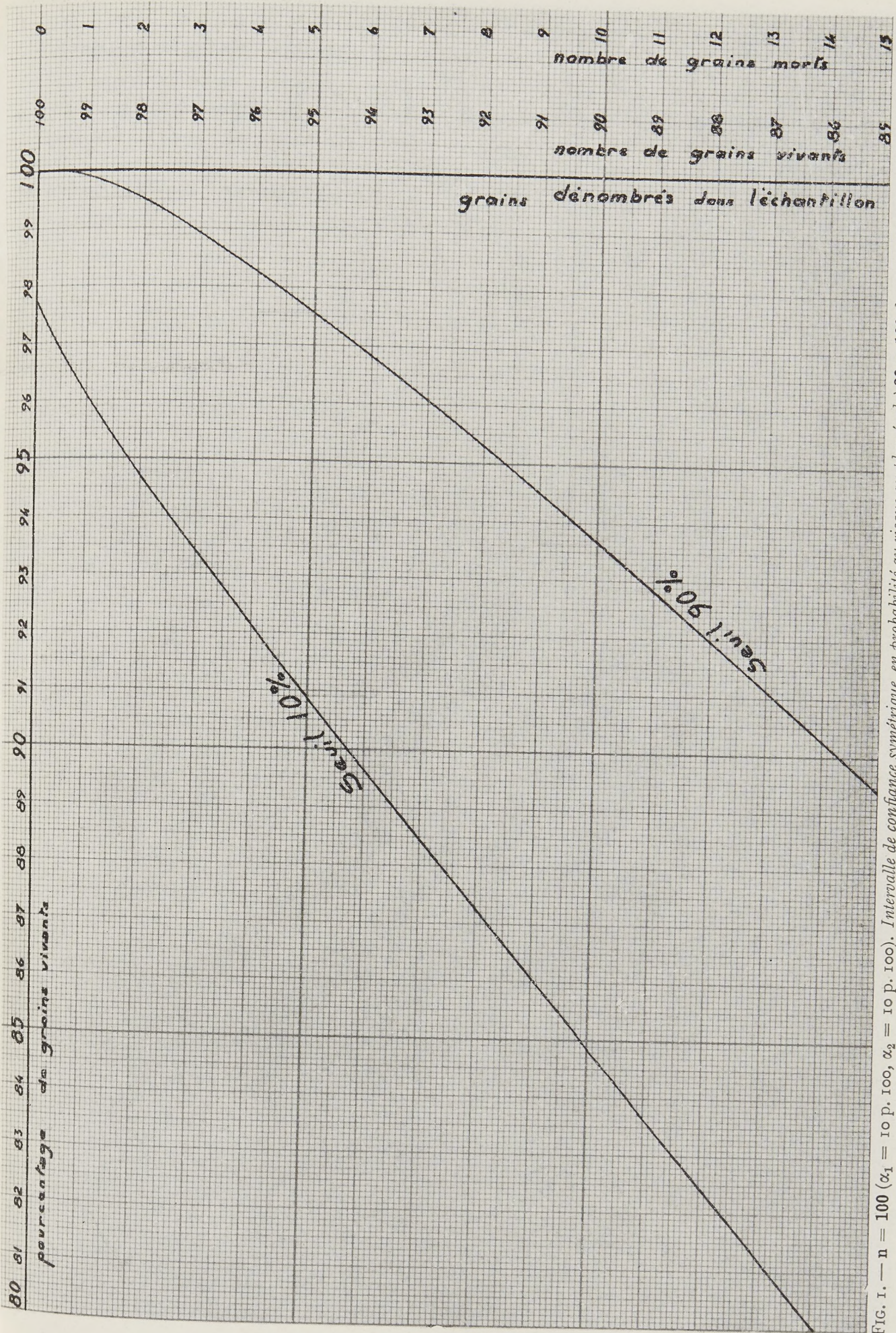
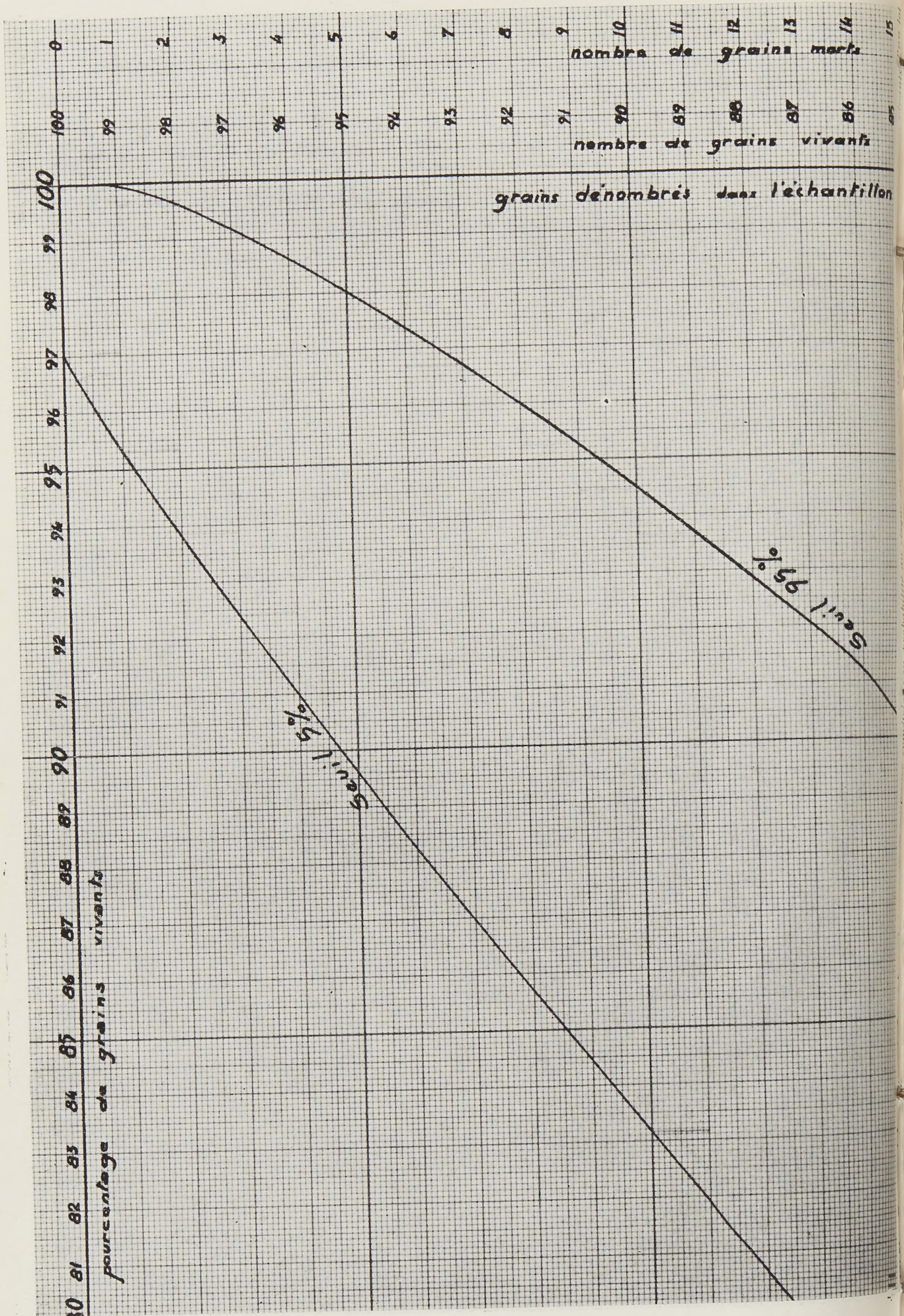


FIG. 1. — $n = 100$ ($\alpha_1 = 10$ p. 100, $\alpha_2 = 10$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 20 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



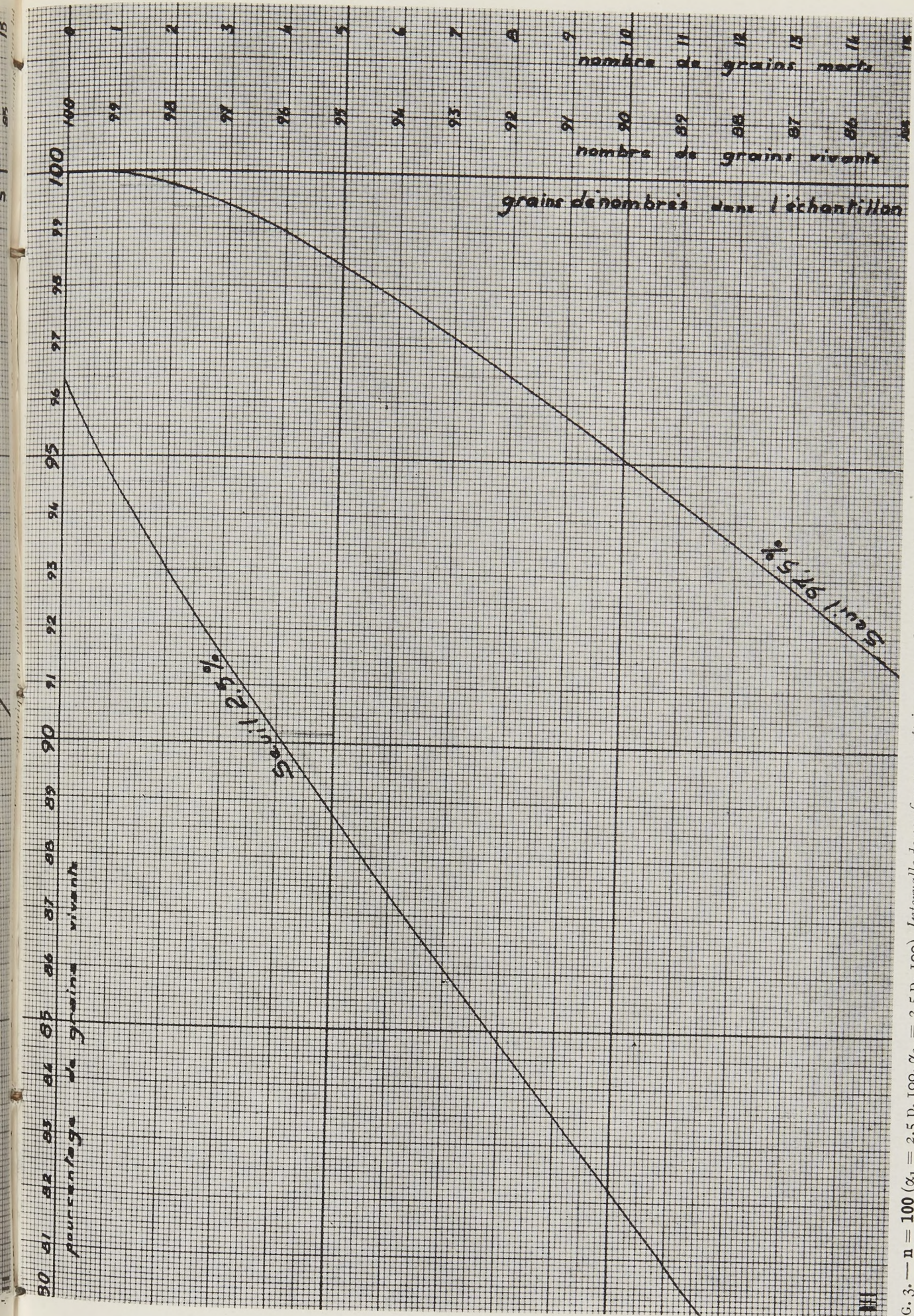
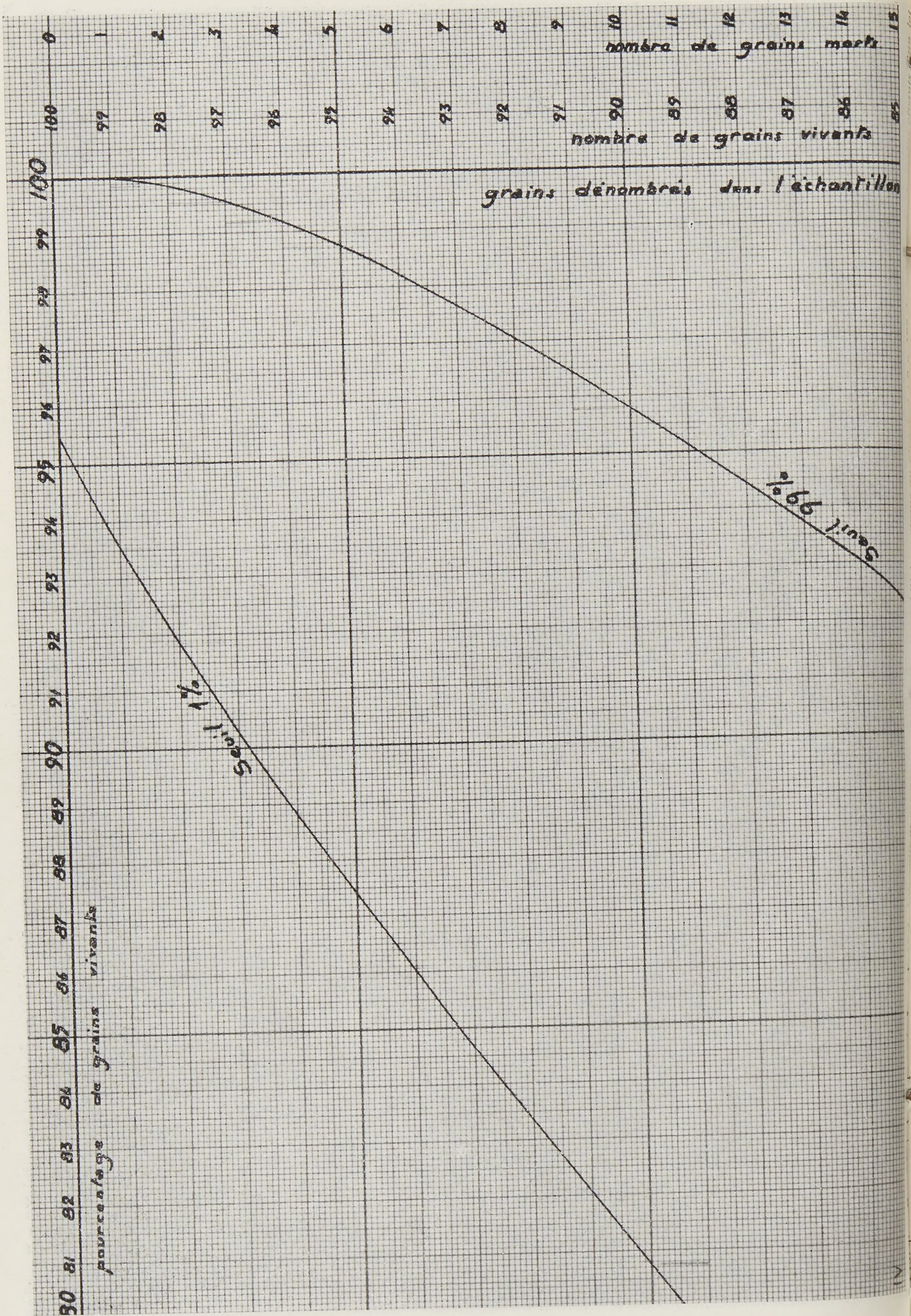


Fig. 3. — $n = 100$ ($\alpha_1 = 2,5$ p. 100, $\alpha_2 = 2,5$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 5 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



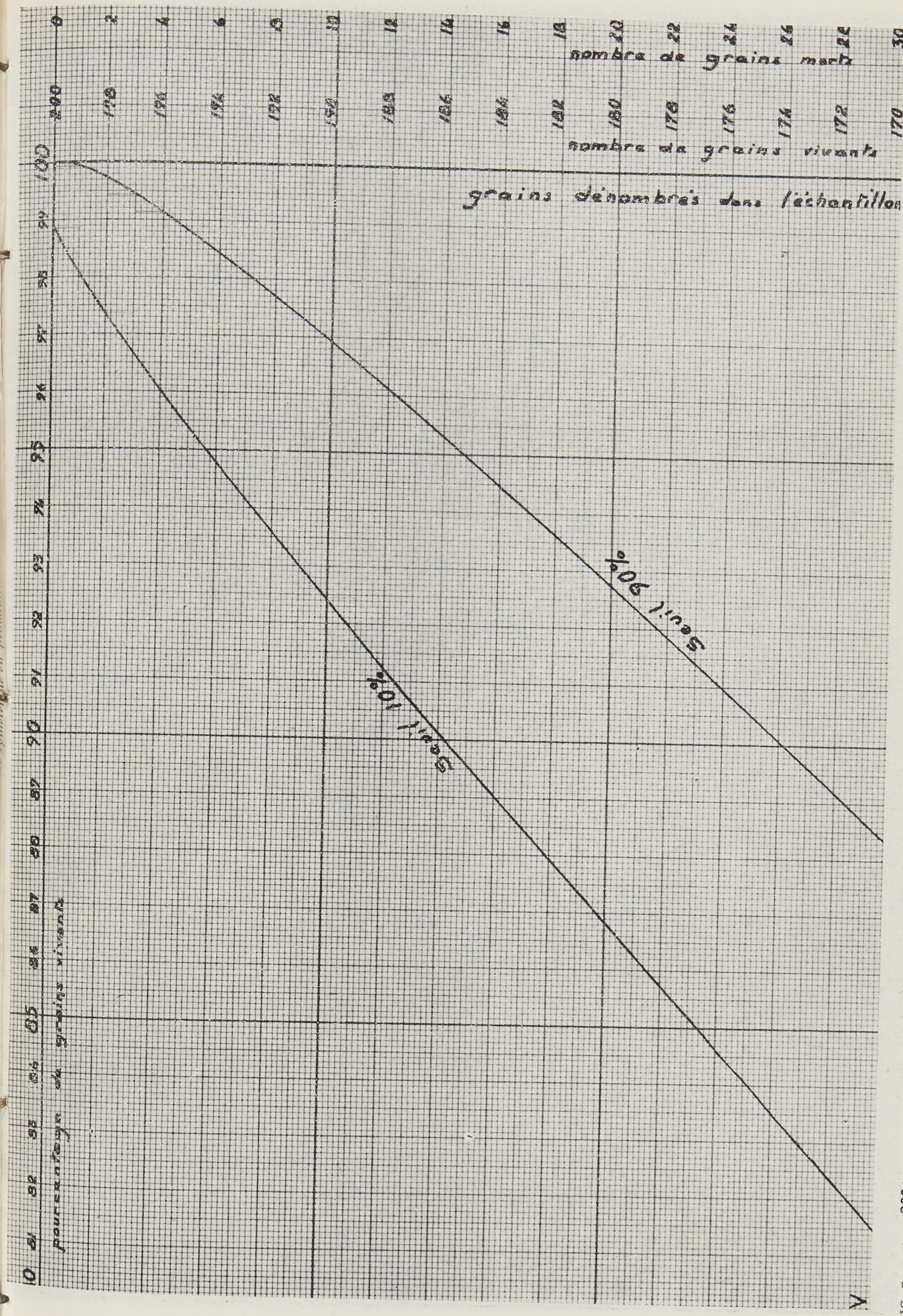
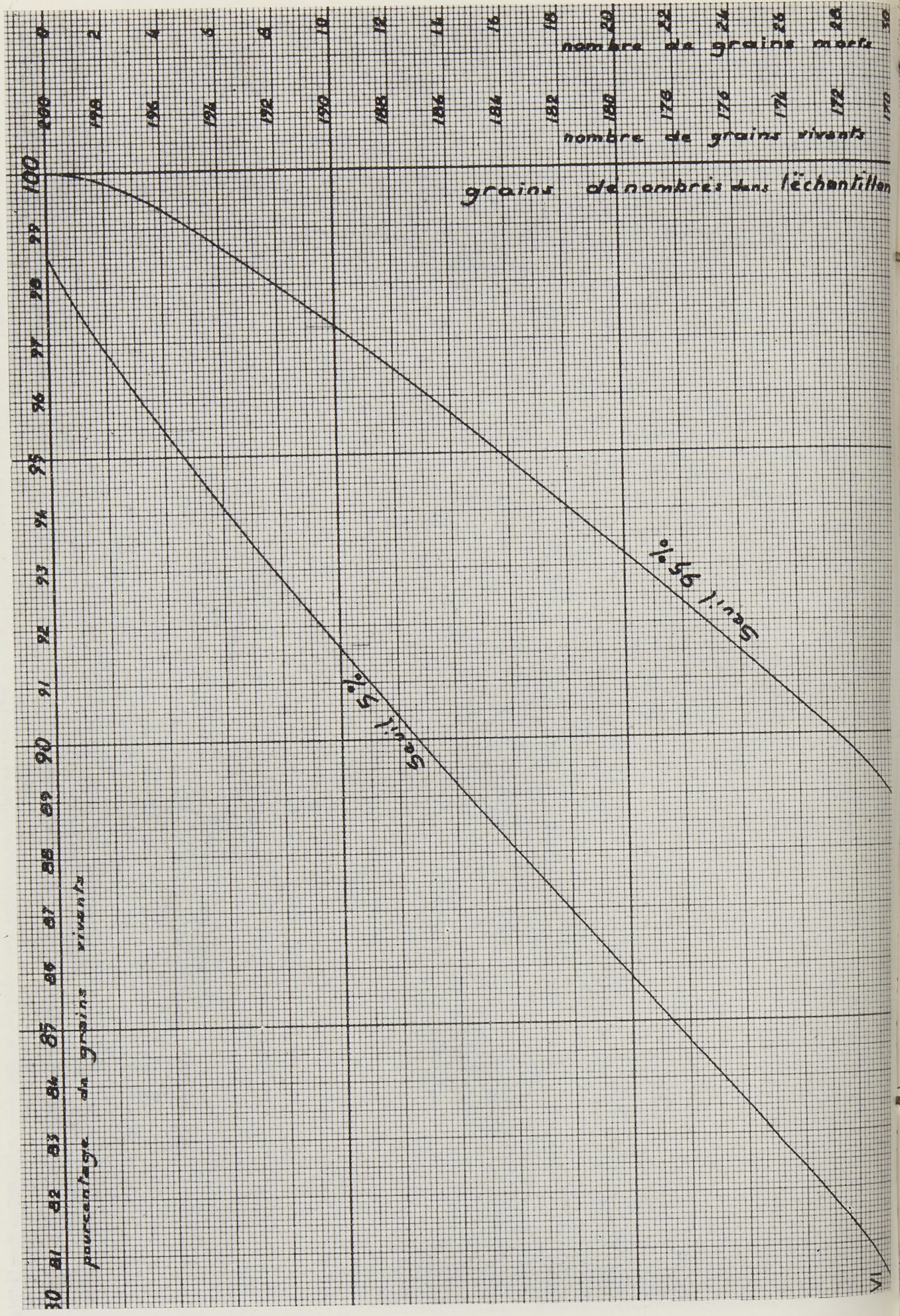


FIG. 5. — $n = 200$ ($\alpha_1 = 10$ p. 100, $\alpha_2 = 10$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 20 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



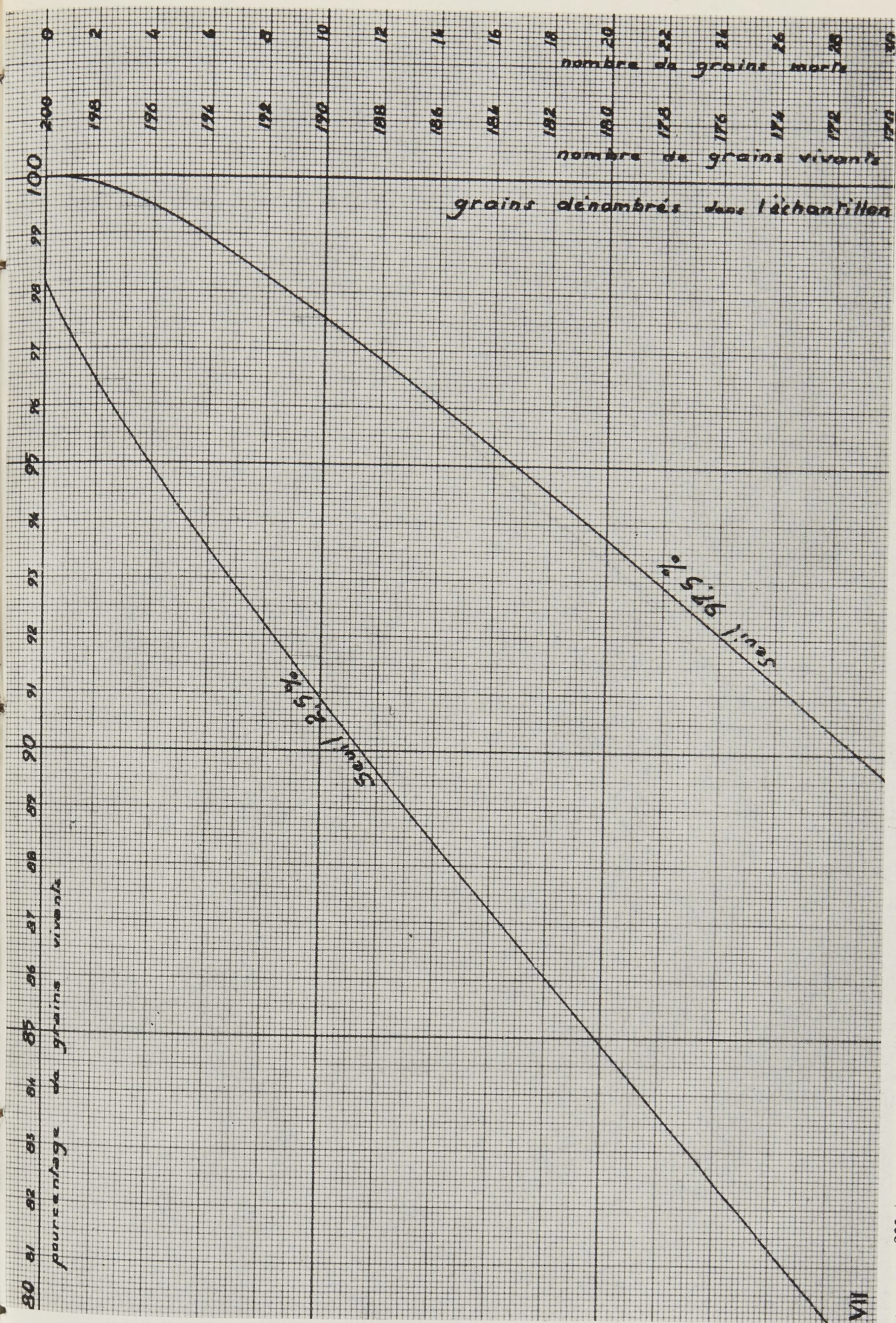
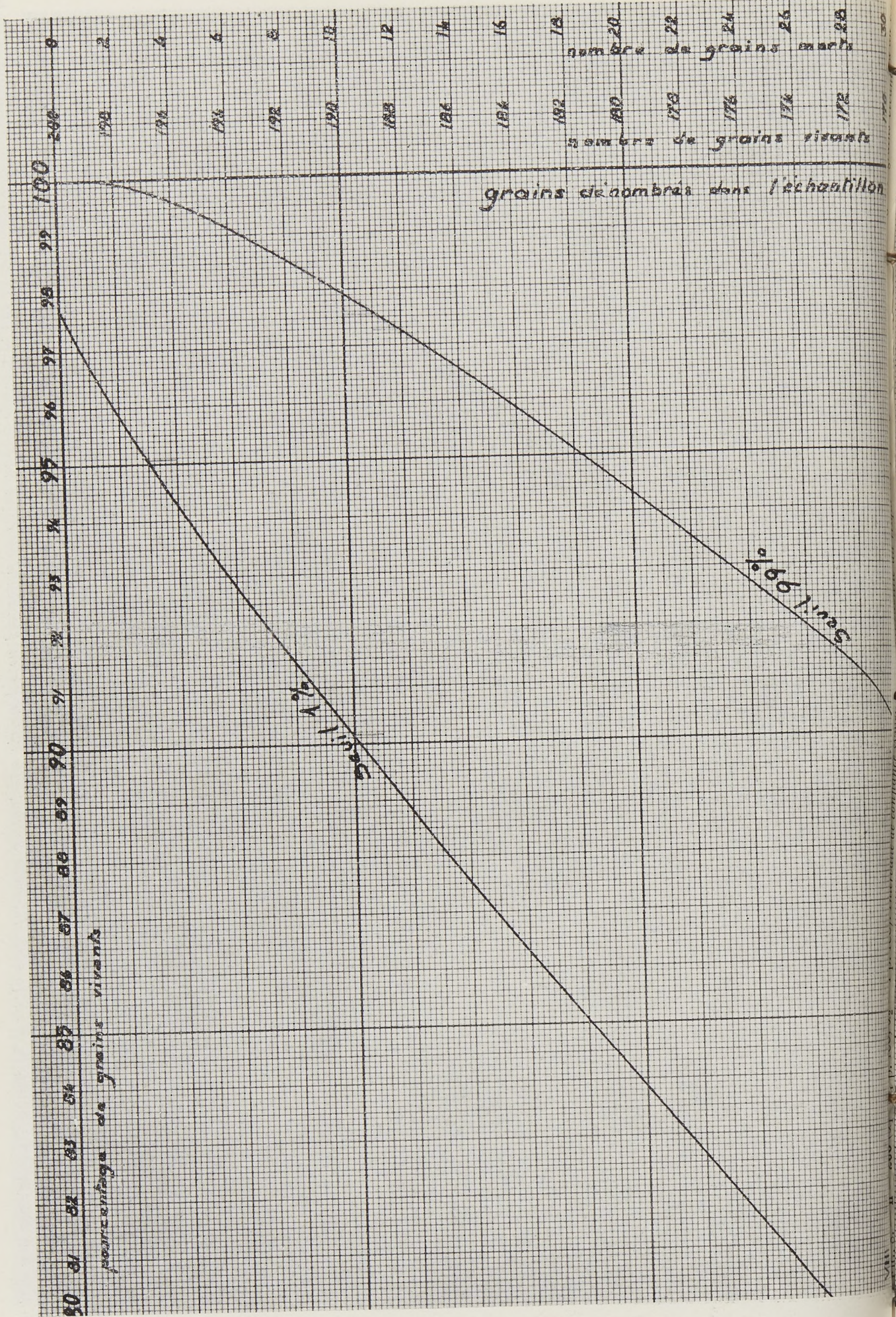


FIG. 7. — $n = 200$ ($\alpha_1 = 2,5$ p. 100, $\alpha_2 = 2,5$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 5 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



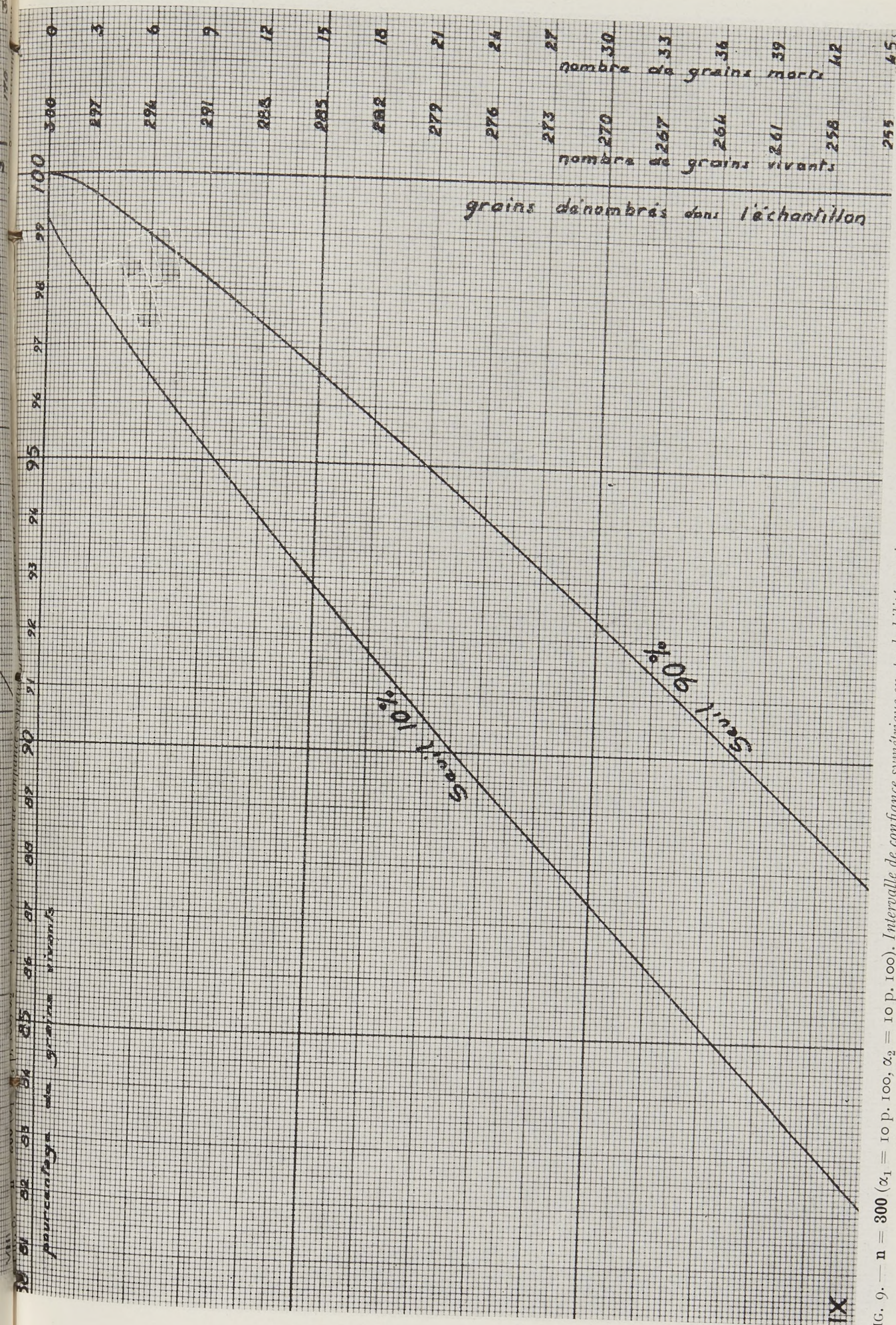
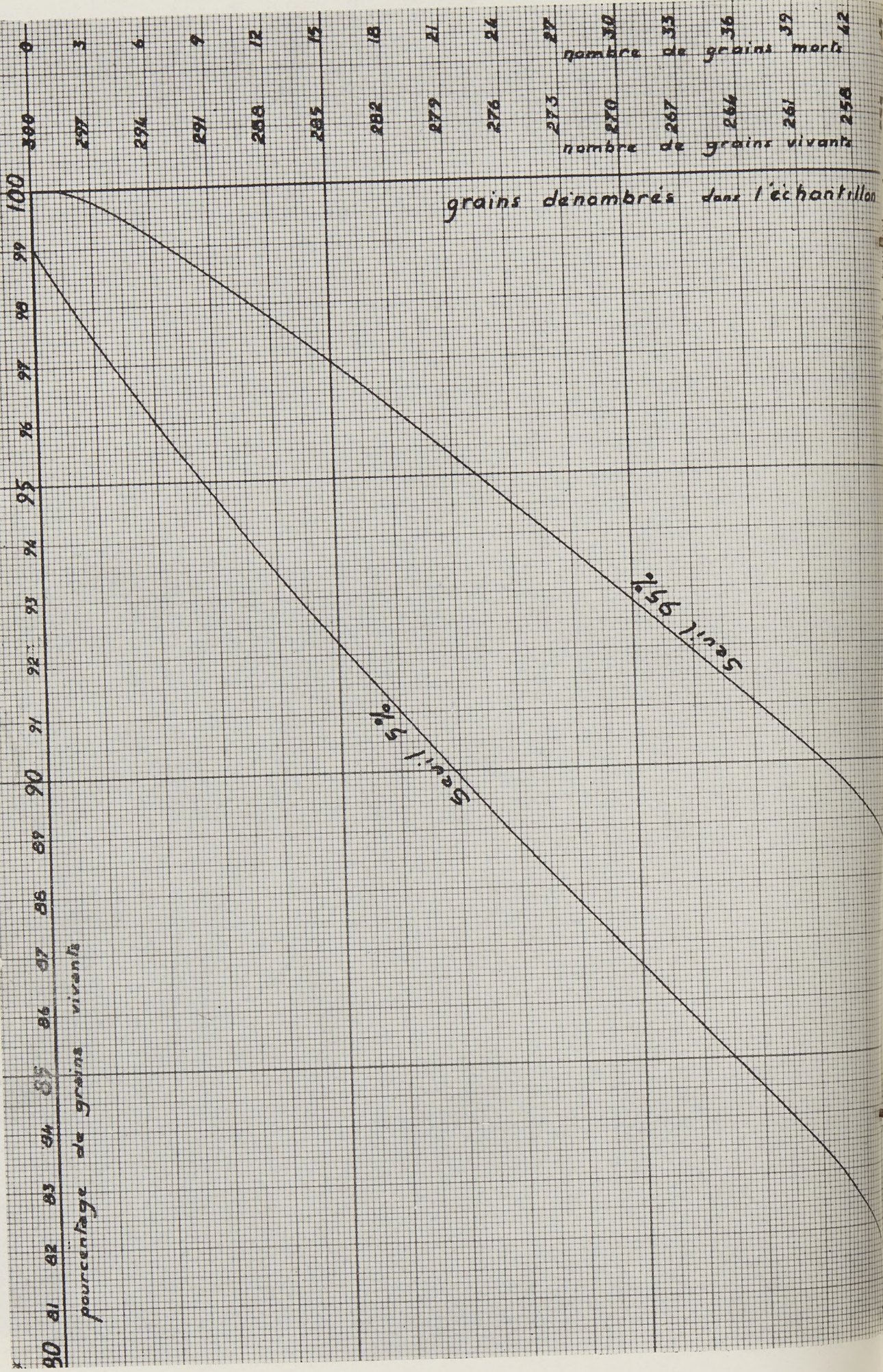


FIG. 9. — $n = 300$ ($\alpha_1 = 10$ p. 100, $\alpha_2 = 10$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 20 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



comme au blus égal à 10 p. 100 du pourcentage de grains vivants (un lot

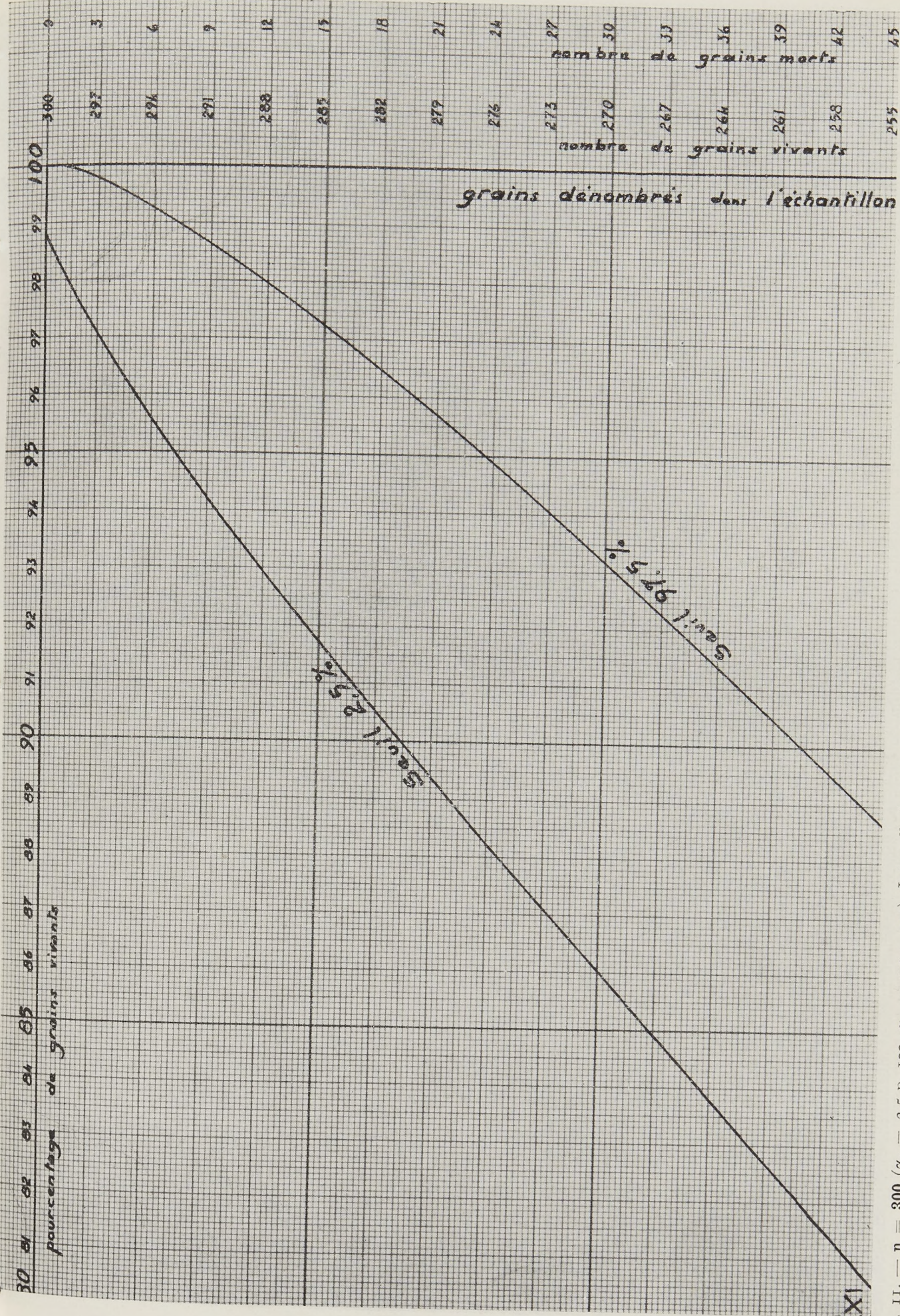
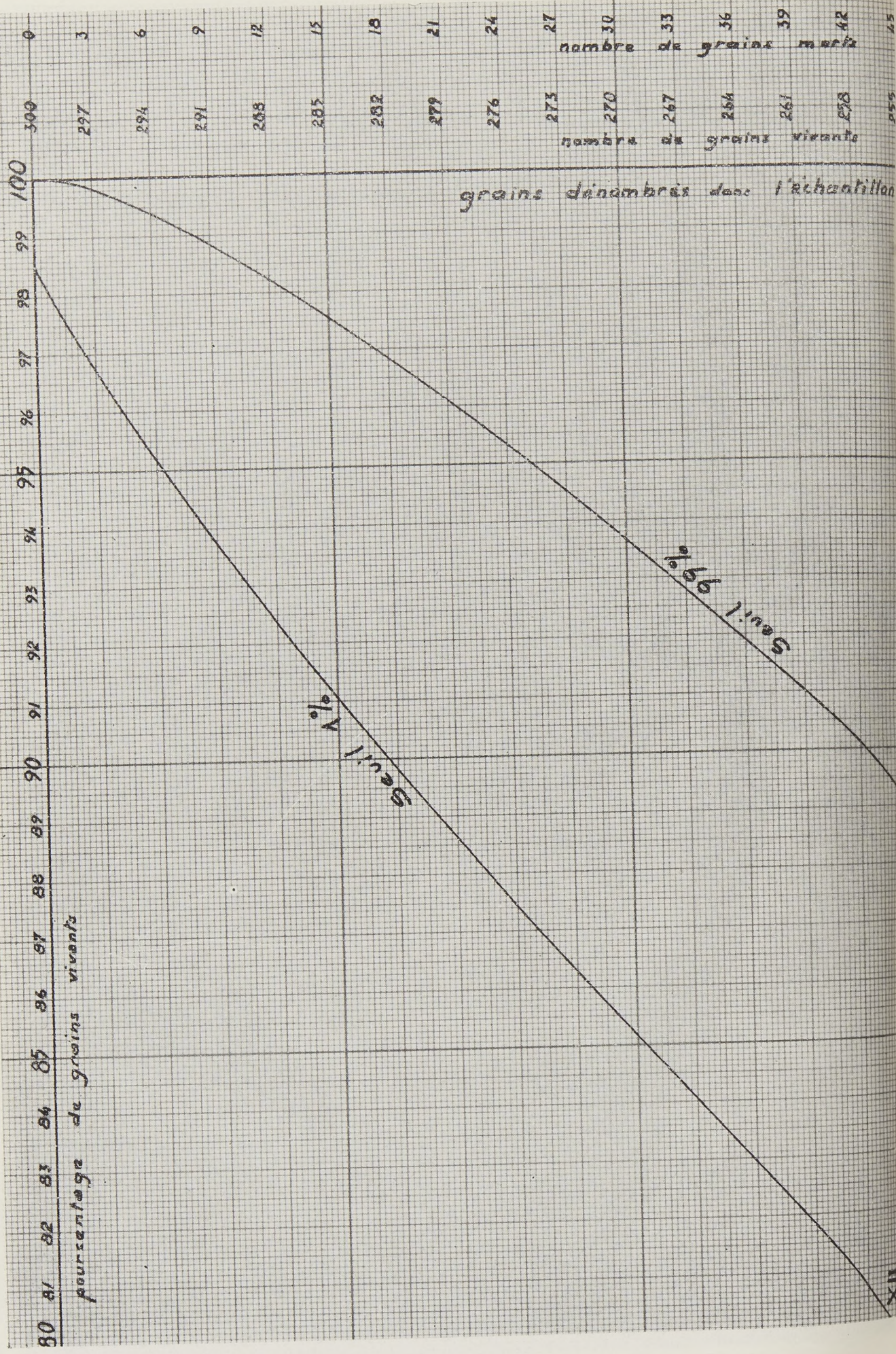


FIG. 11. — $n = 300$ ($\alpha_1 = 2,5$ p. 100, $\alpha_2 = 2,5$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 5 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot.



XII
10. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

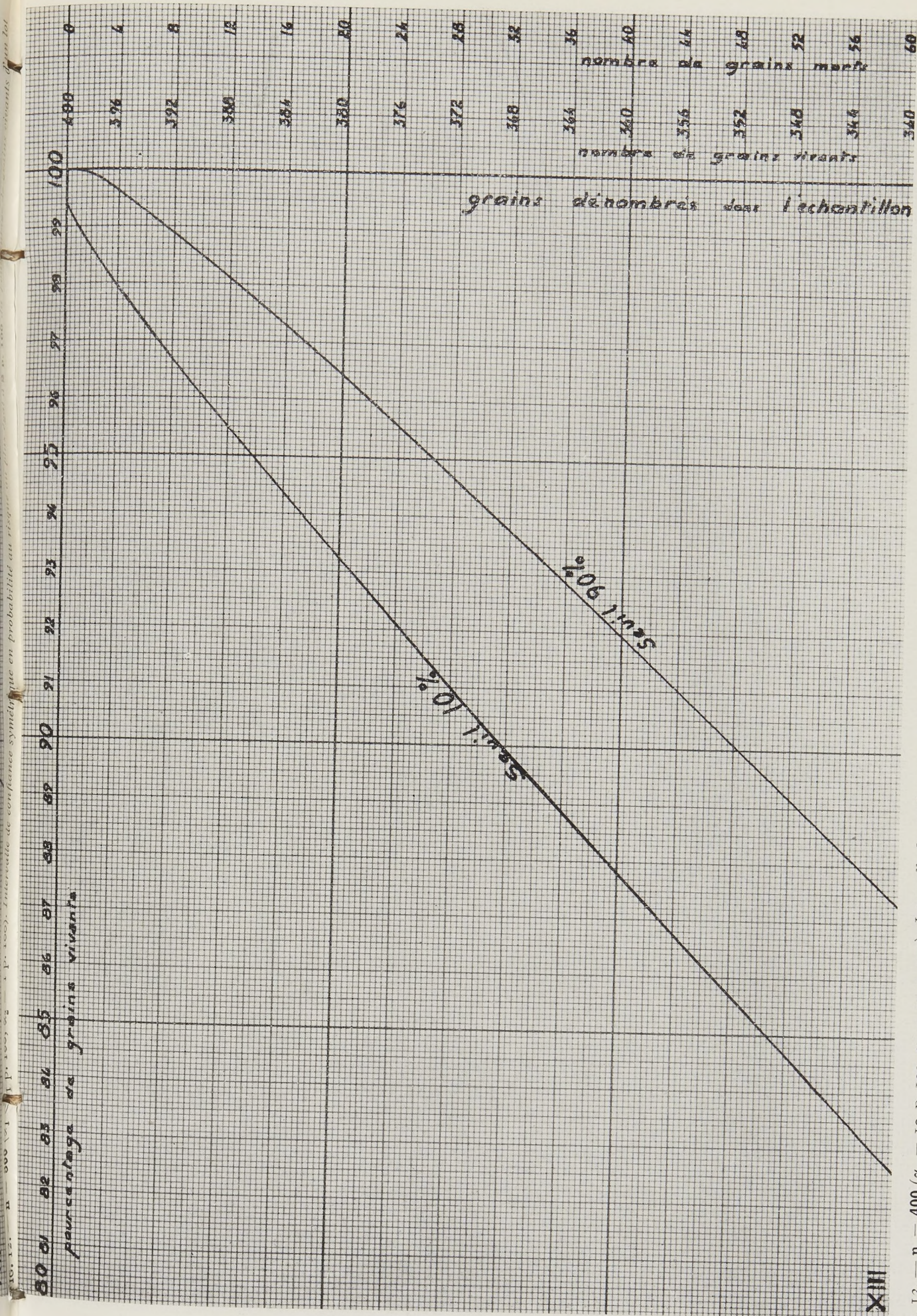
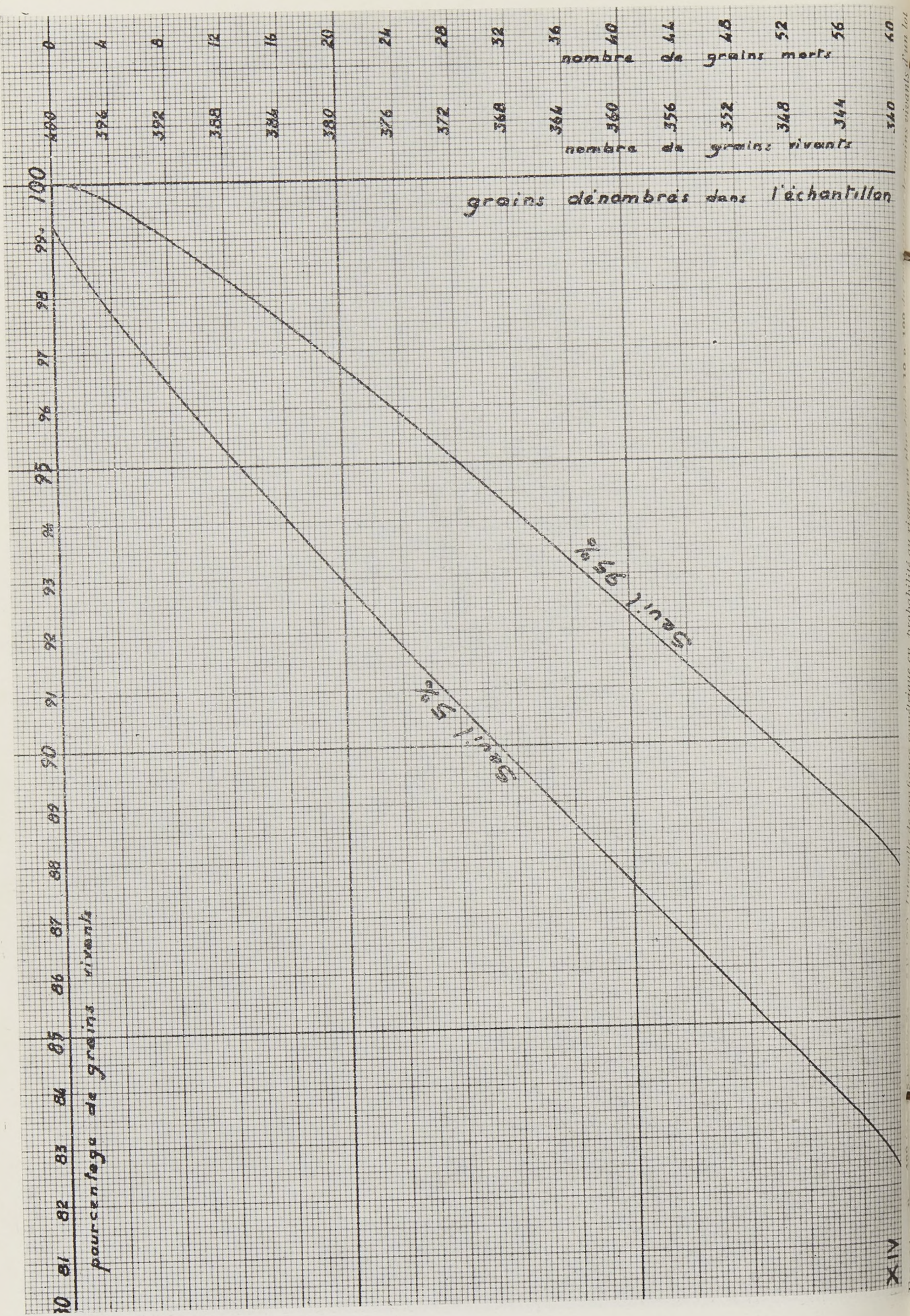


FIG. 13. — $n = 400$ ($\alpha_1 = 10$ p. 100, $\alpha_2 = 10$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 20 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



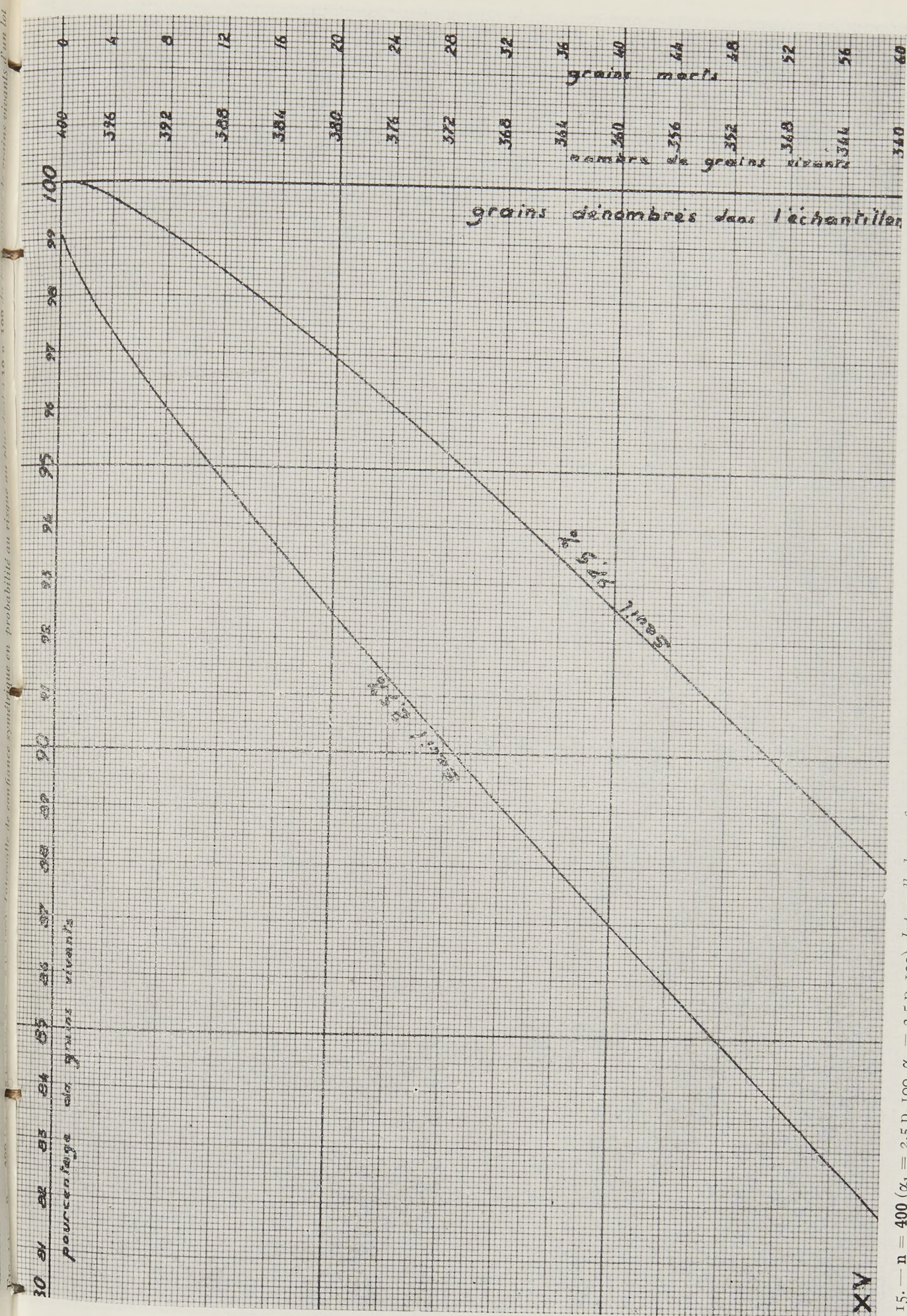
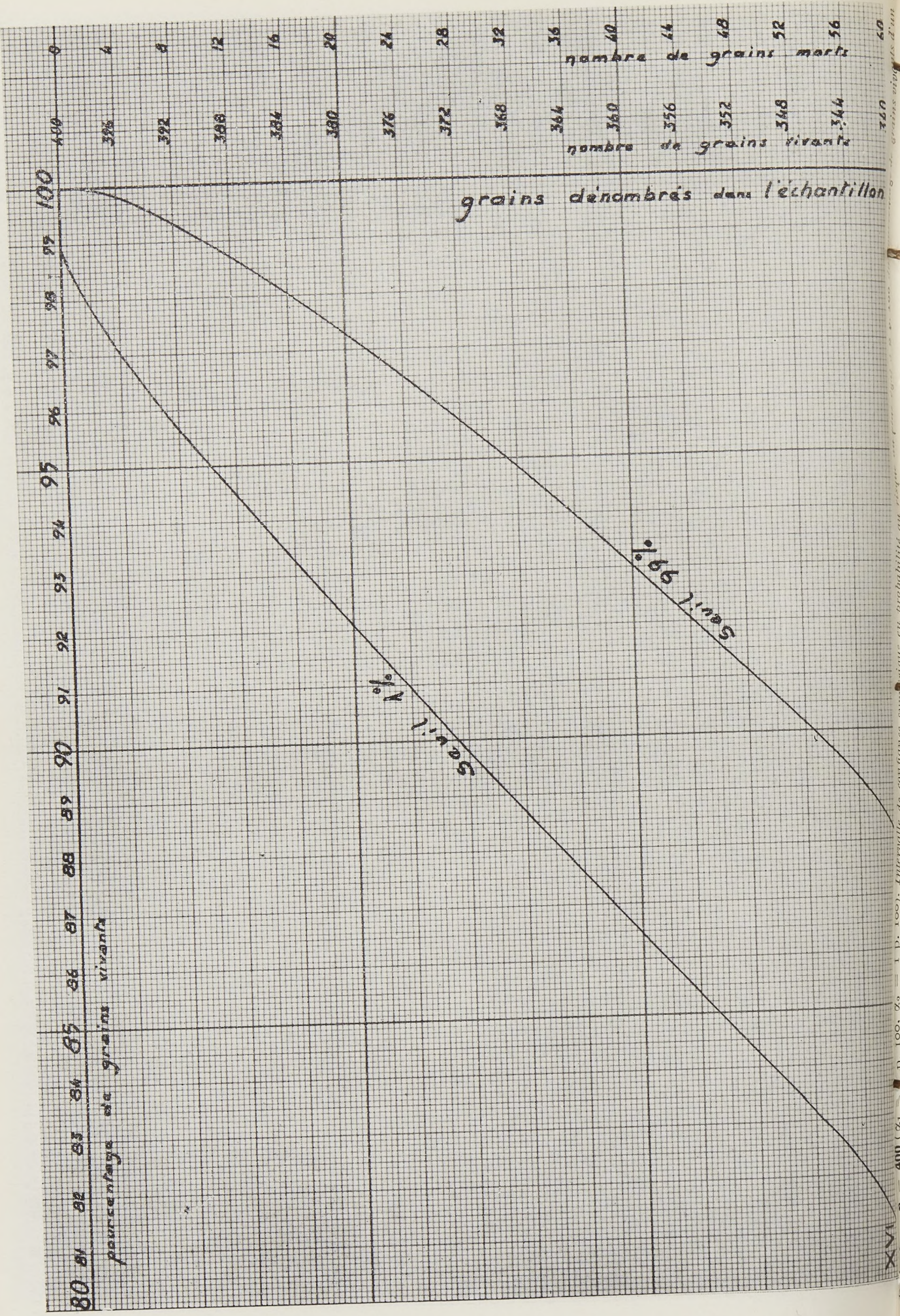


FIG. 15. — $n = 400$ ($\alpha_1 = 2,5$ p. 100, $\alpha_2 = 2,5$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 5 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



XVI
 100 - n = 400 (α_1 - p. 100; α_2 - 1 p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au degré α
 grains vivants d'un lot

XVI
 $n = 400$ ($\alpha_1 = 10$ p. 100, $\alpha_2 = 10$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 20 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot

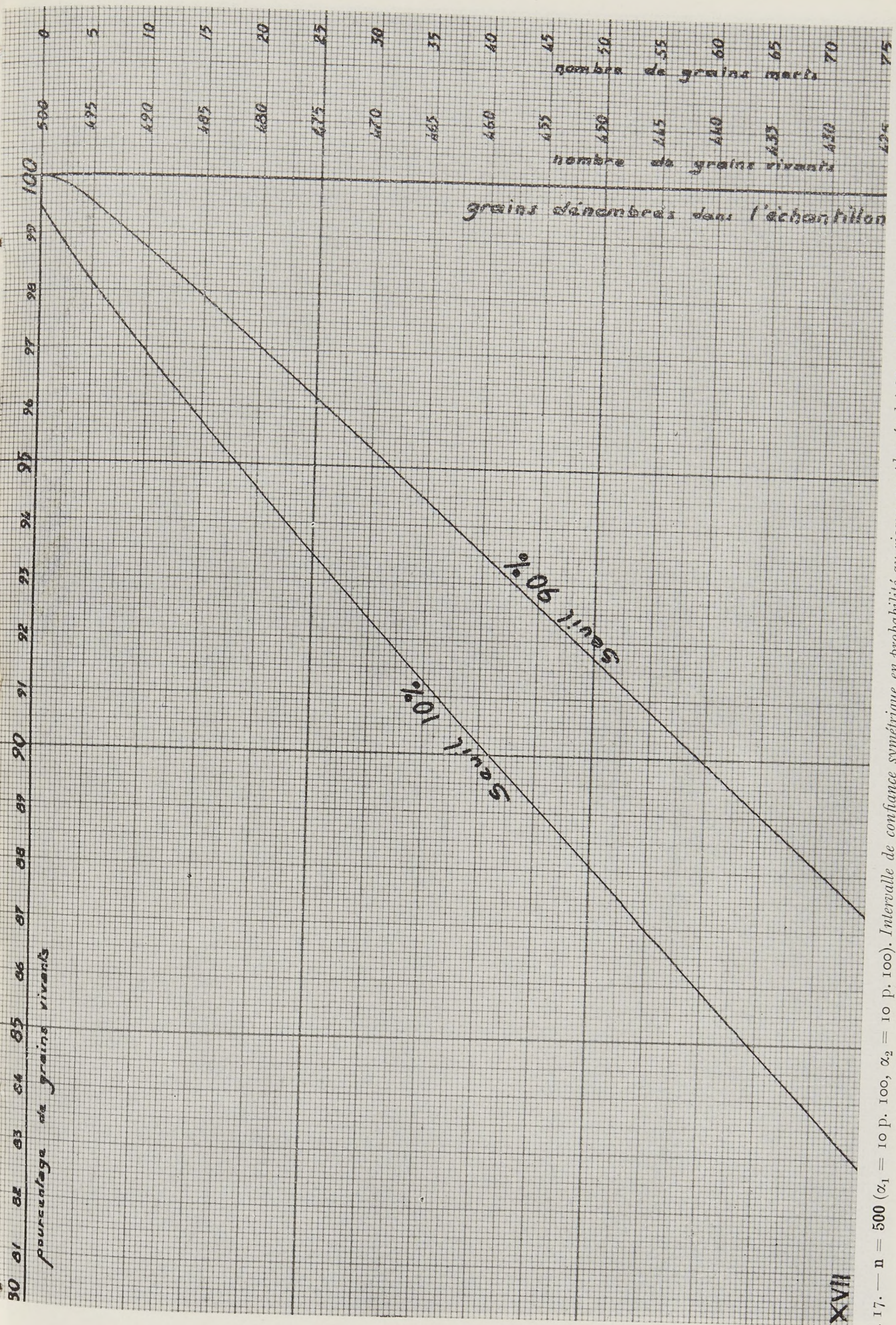
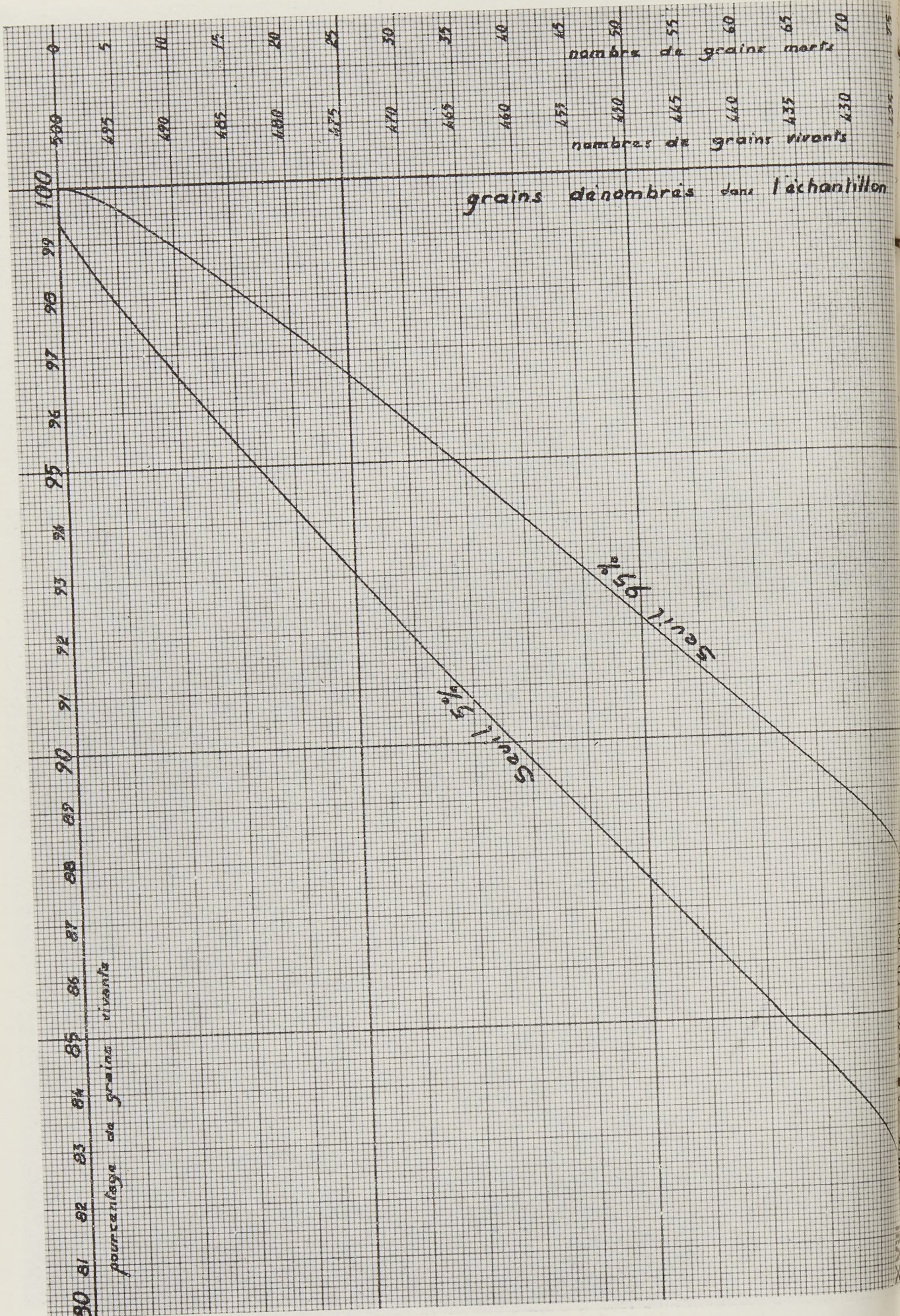


FIG. 17. — $n = 500$ ($\alpha_1 = 10$ p. 100, $\alpha_2 = 10$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 20 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



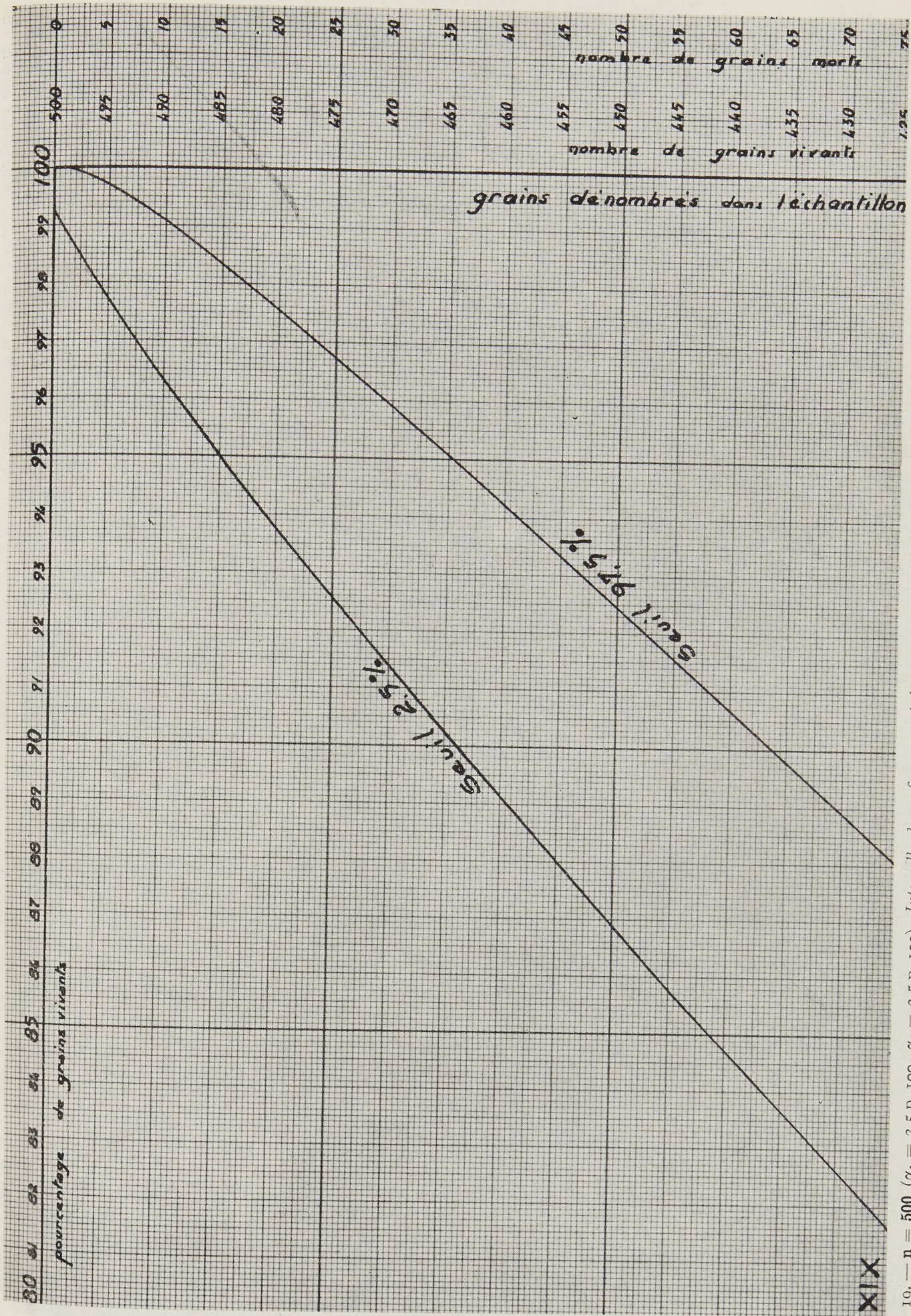
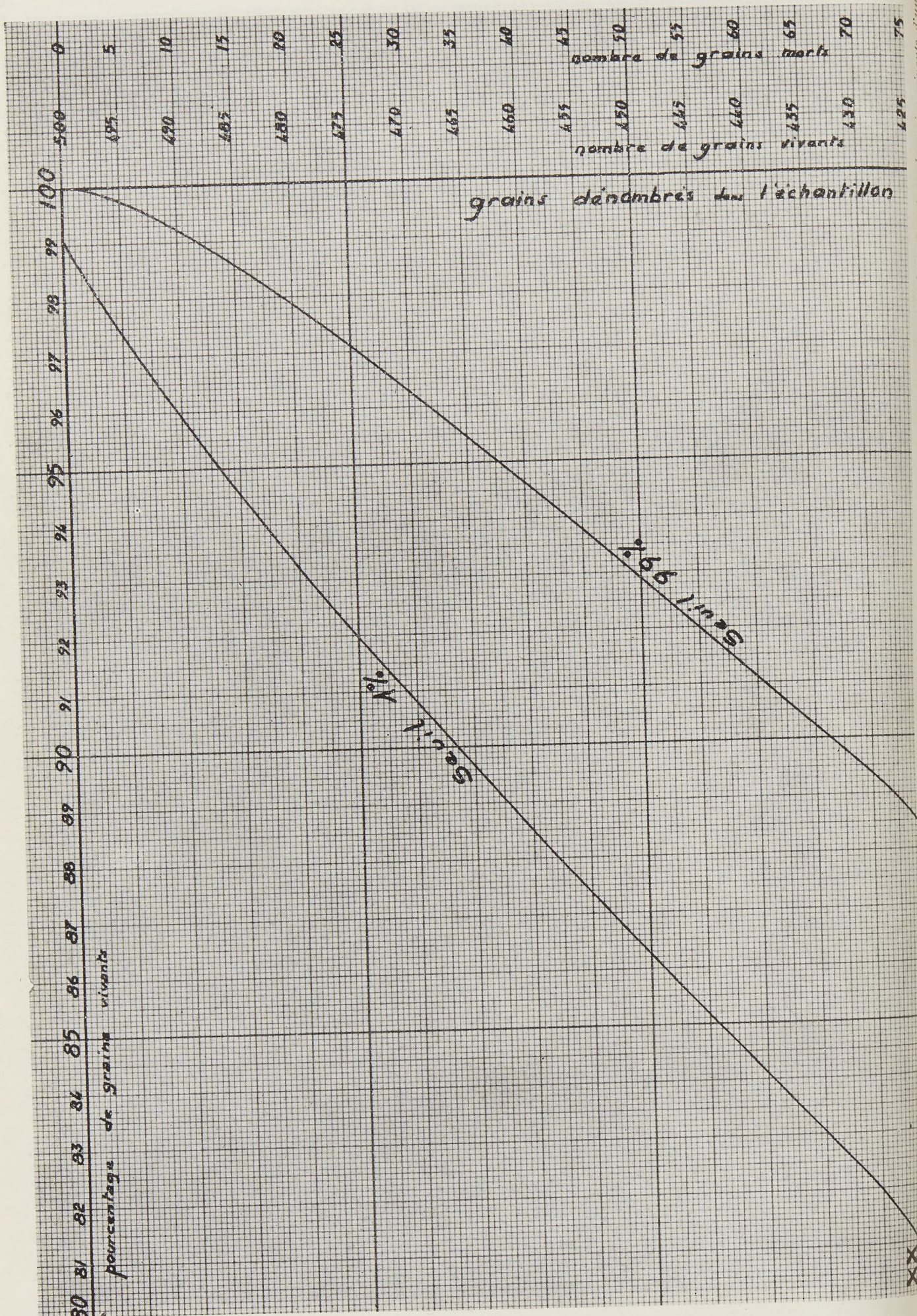


FIG. 19. — $n = 500$ ($\alpha_1 = 2,5$ p. 100, $\alpha_2 = 2,5$ p. 100). Intervalle de confiance symétrique en probabilité au risque au plus égal à 5 p. 100 du pourcentage de grains vivants d'un lot



ANNEXES

UTILISATION DES ABAQUES
INTERVALLE D'ACCEPTATION — INTERVALLE DE CONFIANCE

Ces abaques sont relatifs aux résultats obtenus à partir d'échantillons de taille 100, 200, 300, 400 ou 500.

Pour chaque taille d'échantillon, les courbes tracées donnent — par lecture directe — les bornes de l'intervalle de confiance, symétrique en probabilité, de p au risque α au plus égal à 20, 10, 5 et 2 p. 100. Le risque total α est donc divisé en $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha/2$.

Prenons par exemple, la courbe relative à $n = 100$ et $\alpha = 0,10$ ($\alpha_1 = \alpha_2 = 0,05$). Supposons que l'expérience ait permis de dénombrer 95 grains vivants (soit 5 grains morts) dans l'échantillon de taille 100. On trace, par le point d'ordonnée 95 (ou 5 sur l'échelle : nombre de grains morts), l'horizontale (H) qui coupe la courbe en deux points M_1 et M_2 , dont les abscisses sont respectivement : $p_1 = 89,6$ et $p_2 = 98$.

(89,6-98) est l'intervalle de confiance de p symétrique en probabilité au risque au plus égal à 10 p. 100 ou au niveau de confiance au moins égal à 0,90.

p étant le pourcentage réel inconnu de grains vivants d'où est issu l'échantillon, on dira par abus de langage, que l'intervalle (89,6-98) a une probabilité au moins égale à 0,90 de recouvrir p ou encore que p a une probabilité au moins à 0,90 d'être compris entre 89,6 et 98.

Plus précisément, on dira encore par abus de langage, que l'intervalle (0-98) a une probabilité au moins égale à 0,95 de contenir p et l'intervalle (89,6-100) a une probabilité au moins égale à 0,95 de contenir p ou que p a une probabilité au moins égale à 0,95 d'être supérieure à 89,6 p. 100 et une probabilité au moins égale à 0,95 d'être inférieure à 98 p. 100.

L'utilisation simultanée de deux abaques, permettrait de donner un intervalle de confiance p aux risques α_1 et α_2 — le risque α_1 correspondant à la probabilité que la borne supérieure de l'intervalle de confiance, soit inférieure à la vraie valeur p et le risque α_2 correspondant à la probabilité que la borne inférieure de l'intervalle de confiance, soit supérieure à la vraie valeur p .

(98,7-89,6) est ainsi l'intervalle de confiance de p aux risques $\alpha_1 = 0,01$ et $\alpha_2 = 0,05$ dans le cas où l'expérience a permis de dénombrer 95 grains vivants (5 grains morts) dans un échantillon de taille 100.

Ces abaques donneraient encore, s'il en était besoin l'intervalle d'acceptation au risque α de x , nombre de grains vivants contenu dans un échantillon de taille n prélevé au hasard dans un lot où la proportion p de grains vivants est connue.

Soit $p = 95$ p. 100 par exemple, et $\alpha_1 = \alpha_2 = 5$ p. 100 : on trace par le point d'abscisse 95, la verticale (D) qui coupe la courbe en deux points, N_1 et N_2 d'ordonnée 90,6 et 98,8. On prendra comme limites de l'intervalle d'acceptation de k les entiers 91 et 98, respectivement immédiatement supérieur et immédiatement inférieur à 90,6 et 98,8.

On dira que le nombre de grains vivants k que l'on pourra constater dans un échantillon de taille 100, prélevé dans un lot où la proportion de grains vivants est $p = 95$ p. 100 a une probabilité au moins égale à 0,90 d'être compris entre 98 et 91, ou encore, que k a une probabilité au plus égale à 0,05 d'être supérieur à 98 et une probabilité au plus égale à 0,05 d'être inférieur à 91.

II. — DONNÉES EXPÉRIMENTALES POUR QUELQUES CONTRATS-TYPE

Dans le tableau suivant, nous donnons les tailles d'échantillons à prélever, dans le cas où les normes de qualité et les risques qu'acceptent de courir vendeurs et acheteurs, sont prévus par un contrat commercial.

- p_0 est le pourcentage de grains vivants d'un lot qui sera dit « de qualité marchande moyenne »,
- α_1 est le risque accepté par le fournisseur, de se voir refuser un lot caractérisé par une proportion p_0 de grains vivants,
- c'est-à-dire, qu'un lot de qualité supérieure à p_0 a une probabilité supérieure à $1 - \alpha_1$ d'être accepté.
- p_1 est le pourcentage de grains vivants caractérisant un lot dit « de qualité inférieure limite »

L'acheteur estime que tout lot dont le pourcentage de grains vivants est inférieur à p_1 ne peut être considéré comme commercialisable. Il consent cependant, à courir le risque β d'accepter un lot caractérisé par une proportion p_1 de grains vivants — c'est-à-dire, qu'un lot de qualité inférieure à p_1 , a une probabilité inférieure à β d'être accepté.

Dans la dernière colonne du tableau figure le « nombre critique » k_1 , tel que si le nombre de grains vivants constatés dans l'échantillon est inférieur à k_1 , le lot peut être refusé ou l'expérimentation poursuivie, jusqu'à obtenir une estimation plus précise permettant une décision.

Taille de l'échantillon et « nombre critique » dans le cas de clauses contractuelles déterminées

p_0	p_1	$\alpha \%$	$\beta \%$	n	k_1	$n-k_1$
95	90	5	5	330	305	25
95	90	2,5	2,5	450	416	34
95	90	1	1	620	574	46
92	90	5	5	2 324	2 114	210
92	90	2,5	2,5	3 234	2 942	292
92	90	1	1	4 516	4 109	407
92	88	5	5	654	587	67
92	88	2,5	2,5	903	812	91
92	88	1	1	1 252	1 127	125

- p_0 qualité marchande moyenne ;
- p_1 qualité inférieure limite ;
- α risque du vendeur ;
- β risque de l'acheteur ;
- n taille de l'échantillon à prélever ;
- k_1 nombre critique (minimum de grains vivants) ;
- $n-k_1$ maximum de grains morts entraînant l'acceptation du lot.

NOTE TECHNIQUE

**DISPOSITIFS POUR LA PRÉPARATION RAPIDE
DES CHROMATOGRAMMES A DÉVELOPPEMENTS
RADIAL ET CLASSIQUE**

L. DEIBNER et M. BOURZEIX
avec la collaboration technique de A. MARY

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Le mémoire présente la description détaillée des appareils originaux facilitant la pose rapide et le séchage simultané des taches ou des bandes de départ sur les chromatogrammes circulaires et classiques, mono et bidimensionnels.

I. — INTRODUCTION

La chromatographie circulaire horizontale a été mise au point par RUTTER (1948, 1950). Toutefois, ses lointaines origines remontent à l'analyse capillaire circulaire de RUNGE (1822, 1850, 1855).

Malgré l'intérêt évident de cette nouvelle technique, la littérature scientifique ne mentionne aucun essai de construction d'appareillage destiné à l'élaboration plus aisée des chromatogrammes à développement radial. Cette remarque est valable pour les ouvrages les plus connus concernant la chromatographie publiés par LEDERER et LEDERER (1953), BLOCK, DURRUM, ZWEIG (1958), CRAMER (1958), LISKENS (1959) ainsi que pour les exposés dus à HEILMANN (1956), à BOULANGER et BIZERTE (1959). Même les toutes récentes publications (PEYRON 1958, 1961) relatives aux applications de la chromatographie circulaire ne proposent aucune solution au problème posé.

On a donc été amené à étudier les moyens de doter la chromatographie circulaire d'un dispositif adapté à ses particularités.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

Le mémoire présentera tout d'abord le nouveau dispositif destiné à la chromatographie circulaire et précisera ensuite les nombreuses modifications effectuées sur l'appareil utilisé en chromatographie classique (« orgues chromatographiques »). Ces modifications apportent des améliorations

importantes tant au point de vue de l'augmentation de la commodité de l'appareil qu'à celui des possibilités accrues de son utilisation.

A. — DISPOSITIF FACILITANT L'ÉLABORATION DES CHROMATOGRAMMES A DÉVELOPPEMENT RADIAL

Le dispositif est conçu pour l'utilisation de feuilles chromatographiques circulaires divisées en 5 secteurs égaux, notamment des feuilles de marque WHATMAN (n° 1). Mais il peut, grâce à quelques légères modifications, être adapté à d'autres feuilles chromatographiques circulaires.

En principe, l'appareil rationnellement conçu doit assurer la fixation parfaite des chromatogrammes et la formation de taches de départ de faible diamètre et de contour circulaire net ou de bandes fines. Il doit ensuite rendre rapide la cadence des affusions des liquides à chromatographier ainsi que le séchage des taches ou des bandes. Enfin son but est de permettre le déroulement des diverses manipulations avec le maximum de commodités.

Lors de la mise au point de cet appareil on s'est efforcé de tenir compte de tous ces impératifs. La description du dispositif, donnée dans ce qui suit, démontre que tous les objectifs ont été pleinement atteints.

Description de l'appareil

En gros le dispositif comprend :

- 1°) Un socle en bois 1 ;
- 2°) Un disque mobile 3 avec cinq plots cylindriques pour la fixation du chromatogramme.
- 3°) Un tuyau d'aération 16 qui sert en même temps d'axe de rotation du disque mobile et le système d'amenée d'air 13, 14, 15, 21 ;
- 4°) Un plateau 4 qui se rabat au-dessus du disque 3 et dans l'épaisseur duquel est encastrée une plaque en matière plastique 27 ;
- 5°) Un support 7, 8 avec les porte-godets 12 et les porte-micropipettes 11 ;
- 6°) Un boulier 20.

La figure 1 présente tout d'abord une vue générale du dispositif, ensuite ses deux sections et enfin les détails d'un certain nombre de pièces particulières.

La description de l'appareil suivra l'ordre des manipulations effectuées successivement pendant l'élaboration des chromatogrammes.

1°) *Fixation du chromatogramme.*

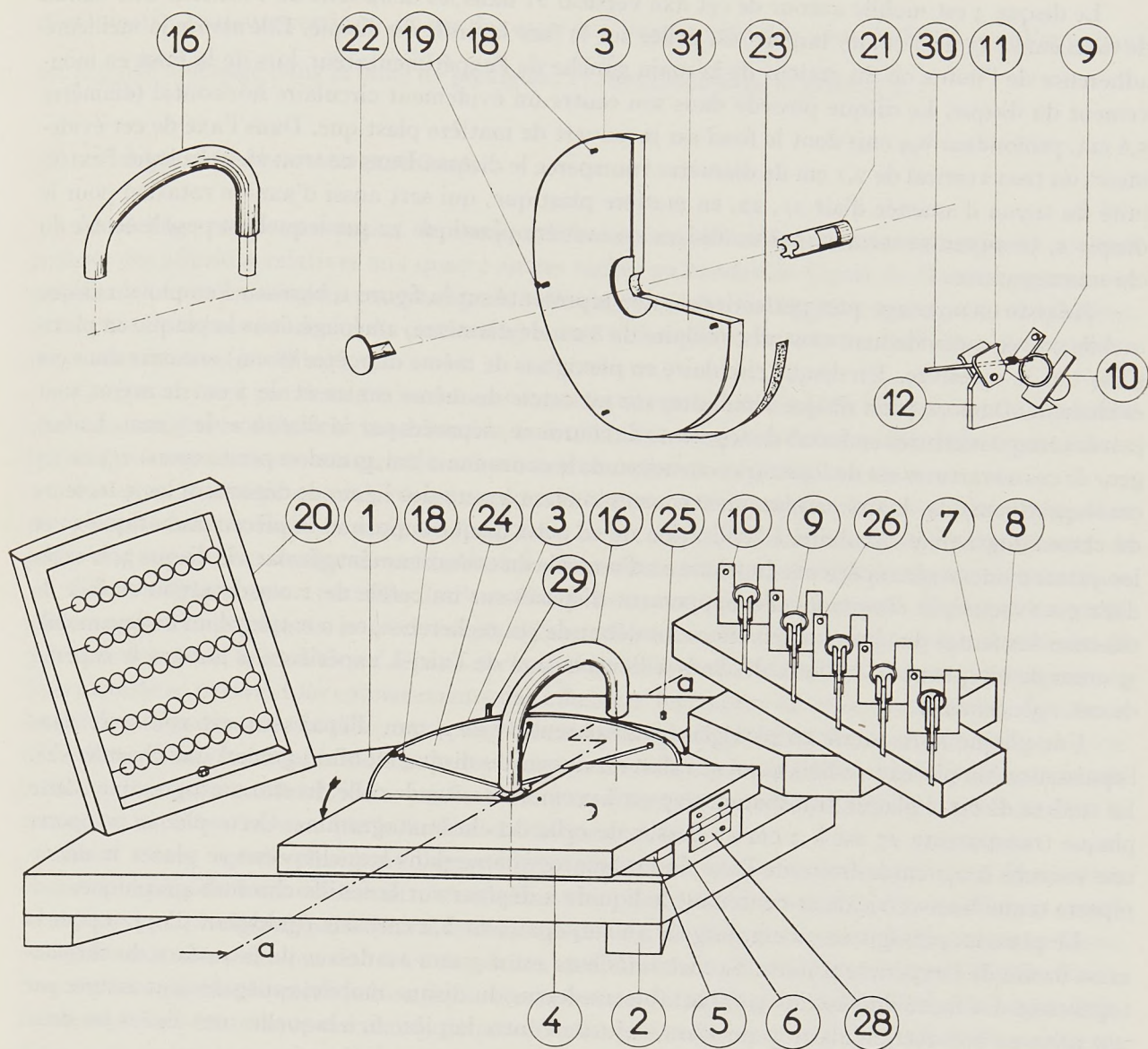
Le chromatogramme est posé sur un disque en bois 3 de 2,5 cm d'épaisseur et dont le diamètre (28,7 cm) est légèrement supérieur à celui du chromatogramme 24 (26,5 cm).

La surface supérieure du disque est recouverte d'une plaque en plexiglass, de 1,8 mm d'épaisseur, afin d'éviter le contact du papier avec le bois.

Le chromatogramme circulaire est fixé sur ce disque grâce à cinq plots, 18, cylindriques, en matière plastique rigide, incrustée dans le disque à 11,3 cm de son centre suivant un pentagone régulier de façon à s'insérer aux extrémités extérieures des fentes radiales qui divisent les feuilles de papier chromatographique commercial Whatman n° 1 en cinq secteurs égaux.

Le disque 3 repose sur un petit anneau, non indiqué sur la figure 1, en plexiglass de 6,5 cm de diamètre de même axe, fixé sur l'axe 16, destiné à diminuer les frottements au cours de la rotation.

Ce disque est posé à son tour sur le socle 1 en bois dont les dimensions sont les suivantes : longueur 60 cm, largeur 30 cm, épaisseur 3 cm. L'axe du disque est à 22 cm du côté droit et à 9 cm du côté avant du socle.



coupe_b.b

coupe suivant_a_a

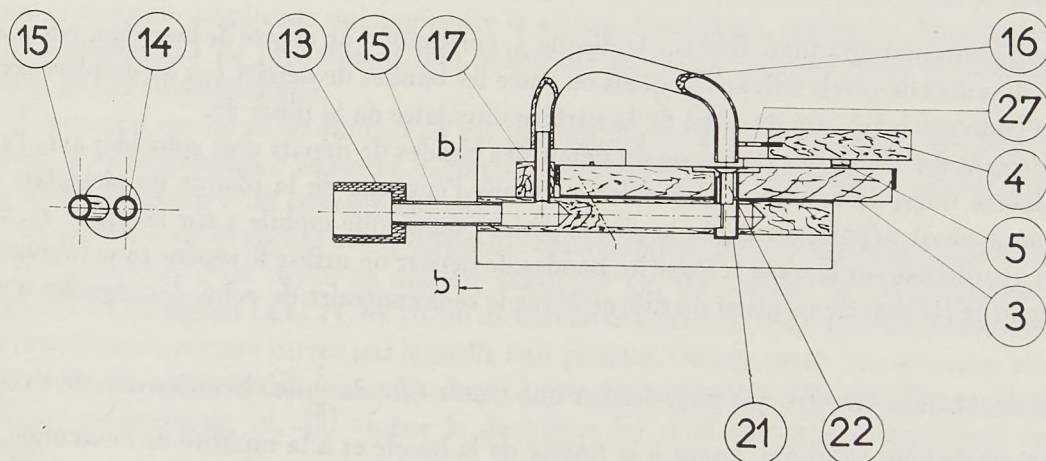


FIG. 1. — Dispositif pour la préparation des chromatogrammes circulaires

Le disque 3 est mobile autour de cet axe vertical 21 dans les deux sens de rotation. Une bande de tissu émeri 23 de 2 cm de largeur est collée sur la face latérale du disque. Elle assure la meilleure adhérence de l'index ou du majeur de la main gauche de l'expérimentateur lors de la mise en mouvement du disque. Le disque possède dans son centre un évidement circulaire horizontal (diamètre 5,6 cm, profondeur 0,4 cm) dont le fond est recouvert de matière plastique. Dans l'axe de cet évidement, un trou vertical de 2,1 cm de diamètre transperce le disque. Dans ce trou vient se loger l'extrémité du tuyau d'amenée d'air 21, 22, en matière plastique, qui sert aussi d'axe de rotation pour le disque 2. Ce tuyau se termine par un disque en matière plastique 22 sur lequel est posé le centre du chromatogramme.

Il existe un montage plus perfectionné, non représenté sur la figure 1, basé sur l'emploi du disque mobile 3 avec un évidement central circulaire de 8 cm de diamètre, aménagé dans la plaque en plexiglass qui le recouvre. Un disque circulaire en plexiglass de même diamètre (8 cm) encastre dans cet évidement. Dans ce petit disque circulaire, sur un cercle de même centre et de 2 cm de rayon, sont percées cinq ouvertures en forme de segments de couronne, séparées par la distance de 3 mm. La largeur de ces ouvertures est de 6 mm (rayon moyen de la couronne 2 cm, grand et petit rayons 2,3 et 1,7 cm respectivement). Leurs emplacements correspondent à ceux des lignes de départ sur les 5 secteurs du chromatogramme circulaire. L'utilisation de ce petit disque supprime la pièce prismatique 22 et les quatre évidements supérieurs du tuyau 21 d'amenée du courant aménagée dans le disque 3. L'excès d'air est évacué par cinq trous d'échappement disposés sur un cercle de 1 cm de rayon en face de chacune des fentes du chromatogramme. Au début de ces recherches, on a employé un disque mobile 3, muni de cinq canaux radiaux destinés à l'évacuation de l'air. L'expérience a montré le superflu de cet agencement.

Une plaque horizontale en plexiglass transparent 27 de 4 mm d'épaisseur est encastrée dans l'épaisseur d'un plateau en bois 4 qui se rabat au-dessus du disque mobile 3 grâce à une charnière 28. La surface de cette plaque transparente 27 est à 2 cm au-dessus de celle du chromatogramme. Cette plaque transparente 27 est à 2 cm au-dessus de celle du chromatogramme. Cette plaque comporte une encoche à 2,2 cm à droite de l'axe du chromatogramme dans laquelle vient se placer la micropipette tenue bien verticale et contenant le liquide à déposer sur la feuille chromatographique.

Le plateau 4 (longueur 30 cm, largeur 16 cm, épaisseur 2,2 cm) sert également d'appui pour la main droite de l'expérimentateur. Sa face inférieure est à 5 mm au-dessus de la surface du chromatogramme. La fixité du plateau 4, rabattable au-dessus du disque mobile, est également assurée par une pièce en bois rectangulaire 5 qui vient s'ajuster contre la pièce 6, à laquelle sont fixées les deux vis inférieures de la charnière 28.

2^o) *Formation de taches ou de bandes de départ.*

Le centre du chromatogramme, fixé sur le disque 3, correspond au centre de la surface circulaire de la pièce 22. Les arcs de cercle suivant lesquels on trace les bandes de départ (ou les emplacements des taches) se trouvent à 1,5 mm du bord de la surface circulaire de la pièce 22.

L'emplacement du centre des taches ou du début des bandes de départ doit coïncider avec l'axe de la micropipette tenue immobile et verticalement dans l'encoche de la plaque de plexiglass 27. Pour faire une tache de départ, on aligne le plot supérieur du disque mobile 3 sur le repère 25, fixé sur le support 17, disposé sur le socle 1. Pour les bandes de départ on utilise le repère 29 se trouvant à gauche du tuyau 16, le sens de rotation du disque étant le sens contraire de celui des aiguilles d'une montre.

L'expérience montre en effet que pour former une bande (arc de $\frac{1}{5}$ de circonférence, de 2 cm de rayon) on obtient de bons résultats, quant à la finesse de la bande et à la rapidité de l'exécution, en maintenant la micropipette verticale et immobile dans l'encoche et en faisant tourner sous elle le disque de $\frac{1}{5}$ de circonférence aussitôt après avoir établi le contact entre la micropipette et le papier.

On obtient de moins bons résultats en laissant le disque immobile et en faisant parcourir à la

micropipette, toujours verticale, un arc de cercle de $\frac{1}{5}$ de circonférence, de 2 cm de rayon en l'appuyant sur le guide aménagé dans la lame de plexiglass 27, incrustée dans le plateau 4.

3^o) Séchage des chromatogrammes.

Le séchage rapide et complet de chaque tache ou bande de départ se produit surtout pendant la durée des affusions relatives aux quatre autres taches ou bandes de départ du chromatogramme et pendant le temps consacré au remplissage et au changement de micropipette qui sépare ces affusions. A cet effet, la mince couronne du chromatogramme qui reçoit les bandes ou les taches est constamment soumise aux jets d'air.

Ces jets arrivent par deux tuyaux dont les extrémités sont dans l'axe du chromatogramme. L'une 16 de ces conduites débouche au-dessus de la feuille, l'autre 21 au-dessous. Ces deux tuyaux dont le diamètre extérieur est 2 cm et le diamètre intérieur 1,6 sont en plexiglass.

Le tuyau supérieur courbé 16 est escamotable par rotation autour de son pied contenu dans une pièce de bois 17 fixée au socle de l'appareil. Le jet d'air qu'il amène, arrive de front contre la partie centrale du chromatogramme et s'étale en courants centrifuges sur la face supérieure de celui-ci.

Grâce à l'obstruction partielle de l'extrémité du tuyau inférieur d'amenée d'air par la partie prismatique triangulaire de la pièce en plexiglass 22, surmontée d'une surface plane circulaire de 3,5 cm de diamètre, le jet d'air est réparti sur la surface inférieure de la couronne du chromatogramme dans laquelle se trouvent les emplacements des affusions. La largeur de cette couronne est de 1,1 cm. La partie prismatique de la pièce 22 a pour base un triangle équilatéral de 1,3 cm de côté et à 3 cm de hauteur. Elle est introduite dans le tuyau 21 de manière que ses arêtes touchent les parois non évidées. L'air passe par les évidements (hauteur 5 mm) sous la partie circulaire de la pièce 22 dont la surface est au même niveau que la surface du disque mobile 3.

Nous avons signalé plus haut l'agencement plus perfectionné se présentant sous forme d'un disque circulaire de 8 cm de diamètre s'emboîtant dans un évidement pratiqué à cet effet au centre de la plaque en plexiglass qui recouvre le disque mobile 3. Ce disque est percé d'ouvertures en forme de segment de couronne (ou de trous circulaires et d'ouvertures d'échappement pour l'excès d'air). Son emploi supprime la pièce prismatique 21, comme on l'a expliqué précédemment. Il est possible, en enlevant ce petit disque circulaire, de procéder au nettoyage éventuel de l'évidement central du disque 3 où arrive le courant d'air inférieur.

D'une manière ou d'une autre, l'air du courant inférieur soulève légèrement le chromatogramme au-dessus du disque mobile 3 tandis que le jet d'air supérieur imprime à la feuille un mouvement contraire. De ces deux courants d'air directement opposés, il résulte une vibration du papier, très rapide et de faible amplitude qui augmente la vitesse du séchage, régularise l'écoulement du liquide à chromatographier en provoquant une multitude de légers contacts entre la micropipette et la surface du chromatogramme.

L'ensemble des deux courants d'air est produit par un séchoir à cheveux ou mieux par un ventilateur de forge (puissance 30 watts, 2400 tours/minute, pression 18 mm). Ce dernier peut être rendu plus silencieux grâce à un coffrage en bois.

La soufflerie est branchée sur le dispositif chromatographique (« tambour chromatographique ») par l'intermédiaire d'un tuyau en matière plastique 13. Du fond de ce tuyau partent deux tubes identiques en plexiglass 14 et 15, de 16 cm de diamètre intérieur. L'un 15 aboutit au tuyau 21, muni à sa base d'une ouverture carrée par laquelle l'air pénètre. Comme on l'a vu, ce tuyau 21 sert à la fois d'axe de rotation pour le disque, et d'amenée du jet d'air inférieur. L'autre tube 14 aboutit au pied du tuyau escamotable 16, qui amène le deuxième jet d'air sur la face supérieure du chromatogramme.

Au besoin il est aisé d'obtenir des jets d'air chaud en utilisant la résistance électrique du séchoir ou en intercalant un tube contenant une résistance entre la soufflerie et le dispositif chromatographique.

4^o) *Dispositifs facilitant les manipulations.*

Pour assurer la commodité du travail de l'expérimentateur, éviter les chutes des micropipettes et parer aux risques d'erreur de pipettage et de comptage des affusions, nous avons complété l'appareil à chromatographie radiale par une batterie des supports pour les béchers et les pipettes et par un boulier.

a. — *Support pour les béchers et les micropipettes*

Les cinq micropipettes et les cinq béchers, 9, de 10 ml de capacité, contenant les liquides à chromatographier, sont placés sur les supports correspondants d'une batterie spécialement conçue.

Cette batterie comprend un socle en bois 8 de 36 cm de longueur sur 7 cm de largeur et de 2,5 cm d'épaisseur ; le socle est percé d'un trou de 2 cm de diamètre situé dans son axe longitudinal à 15 cm du bord droit. Ce trou est l'emplacement d'un axe métallique de 1,9 cm de diamètre qui émerge de 2 cm d'une pièce de bois 7 de 3,5 cm d'épaisseur sur 24 cm de longueur et 15 cm de largeur, fixée dans l'angle arrière droit du socle 1 de l'appareil. La pièce 7 dépasse à droite de 5 cm du bord du socle 1. Ainsi le socle de la batterie des cinq supports est convenablement surélevé au-dessus de la surface du chromatogramme et bien disposé par rapport à l'expérimentateur. De plus il est orientable par rotation autour de l'axe métallique. Dans ce socle 8 sont taillées cinq fentes de 5 mm de largeur sur 6 mm de profondeur disposées à 45° par rapport à l'axe longitudinal du socle. Dans chacune de ces fentes s'emboîte un ensemble de deux supports, un pour une micropipette et l'autre pour un bécher correspondant de 10 ml de capacité.

Chaque double support est en plexiglass et comprend trois parties :

— Une plaque de 5 mm d'épaisseur en forme de triangle isocèle 12, de 8,5 cm de côté dont deux angles ont été convenablement sectionnés comme le montre la figure 1.

— Une pièce carrée 10 (6 cm × 6 cm) encastrée perpendiculairement dans la plaque 12 (une ouverture de 2,2 cm de largeur, pratiquée dans cette pièce 12, reçoit le petit bécher).

— Deux lamelles carrées 11, de 2,5 cm de côté, rivées de part et d'autre du sommet de la plaque 12. Au repos la micropipette est pincée entre ces deux lamelles légèrement flexibles. L'accès au bécher correspondant se trouve ainsi obstrué. Cette obstruction rend impossible tout prélèvement du liquide à chromatographier par une micropipette étrangère. En inclinant la micropipette à 45° en avant et en plongeant son extrémité dans le liquide, on est assuré de son remplissage automatique par capillarité.

b. — *Boulier*

Afin de faciliter le comptage du nombre d'affusions, on utilise un boulier 20, incliné et pivotant autour d'un axe vertical. Le boulier comporte cinq rangées de boules en matière plastique de 1 cm de diamètre. Chaque rangée, comprenant dix boules d'une couleur déterminée, correspond à une micropipette, à un bécher et à un secteur du chromatogramme. Cette correspondance est matérialisée par la fixation d'une demi-boule 10, de même couleur, au support de la batterie et d'une deuxième demi-boule au secteur de la feuille chromatographique qui lui est affecté.

B. — DISPOSITIF POUR LA PRÉPARATION RAPIDE DES CHROMATOGRAMMES A DÉVELOPPEMENT CLASSIQUE

Depuis la publication du mémoire (DEIBNER, BOURZEIX, 1960) concernant l'appareil universel permettant la pose facile et le séchage rapide de plusieurs taches ou bandes de départ sur les chromatogrammes classiques, uni et bidimensionnels, quelques dispositifs assez simples ont été proposés soit pour faciliter la formation des taches de départ (McKIBBINS, HARRIS, SAEMAN, 1960), soit pour activer l'évaporation du solvant pendant l'élaboration des chromatogrammes (GANIS, 1961), (BOOTH, 1961).

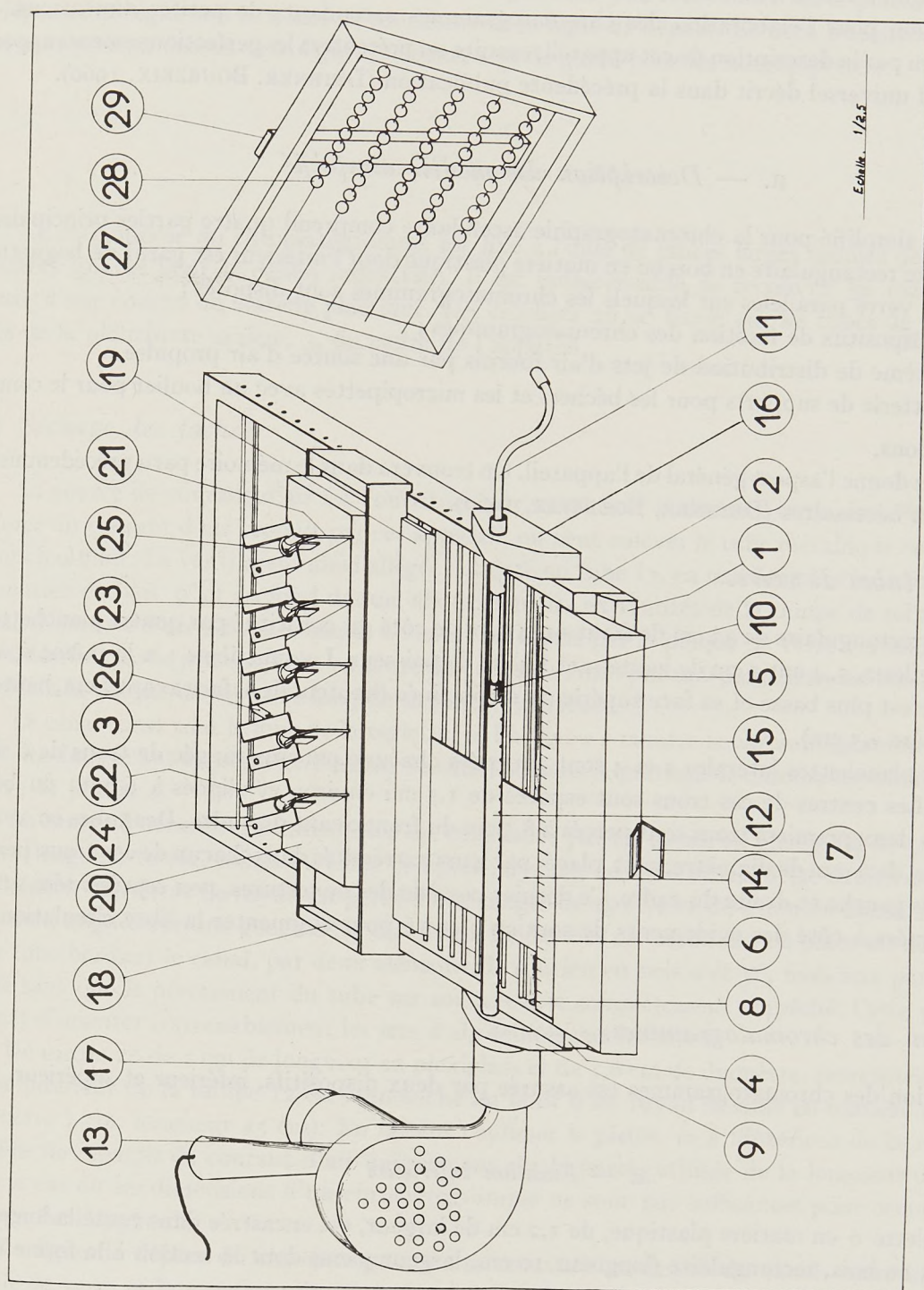


FIG. 2. — Dispositif simplifié pour la préparation des chromatogrammes classiques.

Entre temps on a cherché à perfectionner le dispositif universel et à présenter un modèle simplifié adapté aux besoins de petits laboratoires.

En effet, le dispositif universel nécessite l'utilisation d'une soufflerie relativement puissante (de l'ordre de 300 watts).

Finalement on a réussi à mettre au point un appareillage plus simple, qui depuis plusieurs mois donne satisfaction pour l'élaboration des chromatogrammes ascendants de petites dimensions.

On débutera par la description de cet appareil, ensuite on présentera les perfectionnements apportés au dispositif universel décrit dans la précédente publication (DEIBNER, BOURZEIX, 1960).

a. — *Description du modèle simplifié*

L'appareil simplifié pour la chromatographie ascendante comprend quatre parties principales :

- un cadre rectangulaire en bois ou en matière plastique dont l'intérieur est garni de baguettes ou de tubes de verre parallèles sur lesquels les chromatogrammes sont disposés ;
- deux dispositifs de fixation des chromatogrammes ;
- un système de distribution de jets d'air fournis par une source d'air propulsé ;
- une batterie de supports pour les béchers et les micropipettes avec un boulier pour le comptage des affusions,

La figure 2 donne l'aspect général de l'appareil. On trouvera dans le mémoire paru précédemment tous les détails nécessaires (DEIBNER, BOURZEIX, 1960).

1°) *Cadre à tubes de verre.*

Un cadre rectangulaire de 43 cm de front sur 41 cm de côté est constitué par quatre planchettes. Trois d'entre elles 2, 3, 4 ont 5 cm de hauteur et 1,4 cm d'épaisseur. La quatrième 1 a la même épaisseur, mais elle est plus basse et sa face supérieure est inclinée (hauteur de la face avant 2 cm, hauteur de la face arrière 2,5 cm).

Les deux planchettes latérales 2 et 4 sont perforées chacune par une rangée de trous de 6 mm de diamètre. Les centres de ces trous sont espacés de 1,5 cm environ et alignés à 6 mm du bord supérieur. Les deux premiers trous sont percés à 8,5 cm du front avant du cadre. Des tubes en verre, pleins ou creux de 6 mm de diamètre, sont placés par leurs extrémités dans chacun de ces trous percés dans les parois gauche et droite du cadre. Ce dernier possède des ouvertures, non représentées sur la figure, pratiquées à côté des évidements de soutien 9 et 16 pour augmenter la libre circulation de l'air.

2°) *Fixation des chromatogrammes.*

La fixation des chromatogrammes est assurée par deux dispositifs, inférieur et supérieur.

a. — *Fixation inférieure*

Une réglette 6 en matière plastique, de 1,2 cm de largeur, est encastrée dans toute la longueur du plateau 5 en bois, rectangulaire (longueur 10 cm, largeur 7 cm) dont la section à la forme d'un triangle rectangle.

Au-dessous de la réglette 6 se trouve une plaque de verre rectangulaire (hauteur 3,7 cm, longueur 41,6 cm, épaisseur 4 mm) posée verticalement et encastrée dans les planchettes latérales 2 et 4. Le bord supérieur de cette plaque de verre, sur lequel s'appuie la réglette, est parfaitement rectiligne. Cette plaque de verre, invisible sur la figure 2, est donc parallèle aux parois 1 et 3 du cadre.

Le plateau 5 qui déborde de 3 cm sur le front du cadre, est fixé sur la planchette avant 1 du cadre grâce à deux charnières, invisibles sur la figure 2. Il est maintenue appliqué avec une certaine pression contre le rebord de la plaque de verre par l'intermédiaire de la réglette 6, grâce à deux ressorts.

Deux poignées 7 permettent de soulever la réglette pour introduire l'extrémité inférieure du chromatogramme entre le plateau 5 et la plaque de verre et ensuite l'immobiliser. La ligne de départ se trouve au-dessus du canal d'aération.

Afin de faciliter la pose des taches ou bandes de départ, une plaque en plexiglass non représentée sur la figure 2 (longueur 40 cm, largeur 8,5 cm, épaisseur 3 mm) est collée sur le plateau 5 de manière à dépasser la réglette 6 et à arriver au-dessus de la ligne de départ. Le bord biseauté de cette plaque qui se trouve au-dessus de la ligne de départ sert de guide pour les micropipettes.

b. — *Fixation supérieure*

Le côté opposé du chromatogramme est fixé à l'aide de pinces larges munies de ressorts et de crochets (pinces pour le dessin industriel). Il est indispensable de recouvrir les mâchoires de ces pinces d'une couche de matière plastique. Les crochets 26 se fixent sur les tubes de verre disposés près de la planchette arrière, 3, du cadre de l'appareil.

3^o) *Séchage des taches.*

La source de courant d'air est constituée par un séchoir à cheveux ordinaire. Pour augmenter la force du courant d'air produit par cet appareil, on peut enlever le tube métallique contenant l'élément chauffant. Le ventilateur ainsi allégé s'adapte au tube 17, en matière plastique fixé à l'élément de soutien en bois 9 et au fond duquel aboutissent les extrémités de la rampe de séchage 12 et du tuyau d'amenée d'air 8 dans le canal. Ce canal est formé par la plaque de verre verticale, précédemment décrite, par le premier tube en verre du cadre, et enfin par une planchette en bois, horizontale, accolée à la plaque de verre le long de sa partie inférieure.

Le canal court tout le long de la réglette 6. La figure 2 montre le chromatogramme déplacé vers la droite dans le but de montrer l'orifice du canal 8. Dans la pratique le chromatogramme est ramené contre la paroi 4.

La rampe d'aération 12 horizontale est constituée par un tuyau en plexiglass de 55 cm de longueur (longueur totale, partie invisible comprise, 65 cm), de 2 cm de diamètre extérieur et de 1,6 cm de diamètre intérieur. Ce tuyau est percé d'une rangée de 150 trous, de 2 mm de diamètre, et espacés de 2 mm, alignés sur une génératrice du tuyau. Ce dernier est maintenu en place au-dessus du premier tube bordant le canal, par deux éléments de soutien en bois 9 et 16, fixés aux parois 4 et 2 du cadre sans que le pivotement du tube sur son axe soit complètement empêché. Cette particularité permet d'orienter convenablement les jets d'air débités par les trous.

Un piston 10 de 2 cm de longueur en plexiglass et de 1,6 cm de diamètre, correspondant au diamètre intérieur de la rampe 12 est emmanché au bout d'un tuyau flexible en matière plastique 11 (diamètre 1 cm, longueur 45 cm). En faisant coulisser le piston 10 à l'intérieur de la rampe, il est possible de répartir de courant d'air uniquement sur la partie utilisée de la longueur de la rampe, dans le cas où les dimensions d'un chromatogramme ne sont pas suffisantes pour occuper toute la largeur de l'appareil.

La ligne de départ du chromatogramme se trouvant au-dessus du canal, entre le bord de la plaque de verre et le premier tube en verre. Elle peut être centrée sur l'axe du canal à l'aide d'un fil spécial. La distance entre le dessous de la rampe d'aération et la surface du chromatogramme est de 6 mm.

Ainsi, les taches ou les bandes de départ sont séchées à la fois par le courant d'air circulant dans le canal sous le chromatogramme, et par des jets d'air inclinés, qui jaillissent des trous de la rampe d'aération 12. Il est possible de réguler l'action de ces jets par une rotation de la rampe. L'efficacité de cette dernière est facile à contrôler au moyen d'une mince couche de sable fin répandu sous forme d'une bande sur une feuille de papier chromatographique.

4°) Dispositif facilitant les manipulations.

a. — Supports pour les béchers et les micropipettes

La batterie des cinq supports 20 pour les béchers 22 et les micropipettes 23 est exactement la même que celle utilisée avec l'appareil destiné à l'élaboration des chromatogrammes circulaires et décrite plus haut.

Cette batterie est disposée dans une sorte d'augette 18 susceptible de coulisser sur les bords des parois 4 et 2 du cadre, au-dessus des tubes de verre, comme le montre la figure 2.

Une plaque 19, en plexiglass de 2,5 cm d'épaisseur, 42 cm de longueur et 4,5 cm de largeur, fait partie de l'augette 18, sa face inférieure se trouve dans le même plan que le dessous de l'augette coulissante. La plaque 19 est destinée à protéger le chromatogramme contre les chutes éventuelles de gouttes de liquides à chromatographier. A cet effet, l'augette est ramenée complètement vers la rampe de séchage 12.

Le socle de la batterie des supports peut coulisser dans l'augette.

b. — Boulier

Le comptage des affusions est facilité par l'utilisation d'un boulier, placé à gauche (et non à droite comme le montre le dessin).

Les boules 28 sont au nombre de 10 par rangée. Chaque rangée a une couleur donnée. Chacun des supports 22 possède une demi-boule 24 en matière plastique, d'une couleur correspondant à celle d'une rangée de boules déterminées.

b. — Perfectionnements apportés au dispositif universel

L'appareil universel destiné à la chromatographie uni et bidimensionnelle (DEIBNER, BOURZEIX, 1960) a profité de tous les perfectionnements décrits dans cet exposé concernant le dispositif simplifié.

Les voici énumérés. Tout d'abord le tube d'aération supérieur mobile a été muni d'un piston mobile. Son utilisation peut être complétée par l'emploi de caches sous forme de plaques en plexiglass à disposer au-dessus du canal d'aération dans le cas où les dimensions des chromatogrammes sont insuffisantes pour couvrir complètement la surface utile au cadre à tubes de verre. L'augette coulissant le long des parois latérales du cadre et contenant la batterie des supports pour les béchers et les micropipettes, ainsi que le boulier pour le comptage des affusions, ont complété l'agencement de l'appareil universel.

Bien entendu, l'augette possède à l'avant la plaque en plexiglass destinée à protéger la surface du papier pendant les affusions des liquides à chromatographier.

Il est évident que d'autres perfectionnements de notre appareil sont toujours possibles. C'est ainsi que sur le dispositif de fixation du bord inférieur du chromatogramme, près de la ligne de départ nous avons supprimé l'emploi du ressort en le remplaçant par deux charnières convenables, et par des fermetures latérales à crochets.

En ce qui concerne la source d'air propulsé, l'expérience nous a démontré que l'utilisation des aspirateurs d'appartement, transformés en soufflerie de 300 watts de puissance, constitue une meilleure solution pour les laboratoires ne possédant pas de canalisation d'air comprimé. Les essais avec les ventilateurs de forge ne nous ont pas donné des résultats positifs.

Il nous reste à signaler qu'actuellement nous utilisons les micropipettes de marque Pleuger (83 U 020 n° B) de 2 microlitres, à remplissage automatique au lieu de micropipettes automatiques démontables de marque Société Verre et Technique. En effet, l'achat de ces dernières est devenu très difficile en raison des conditions particulières de vente.

CONCLUSION

La mise au point d'appareils pour la préparation des chromatogrammes circulaires ne paraissait pas jusqu'à ce jour un problème technique résolu.

En proposant le premier prototype d'un tel dispositif, on a tenu compte des impératifs d'efficacité et de simplicité sans lesquelles la solution trouvée serait imparfaite sur le plan pratique.

Par la suite les divers dispositifs auxiliaires de travail, dont l'appareil a été doté, ont été utilisés pour compléter l'agencement de l'appareil destiné à l'élaboration des chromatogrammes classiques, proposé en 1960. En plus des perfectionnements reçus, cet appareil universel a subi un certain nombre de simplifications pour donner naissance à une variante mieux adaptée aux servitudes de la chromatographie ascendante courante.

En définitive, l'ensemble des appareils proposés constitue une contribution utile au développement des techniques d'exécution propres à la chromatographie sur papier.

Reçu pour publication en mars 1963.

SUMMARY

APPARATUS FOR THE RAPID PREPARATION OF RADIALLY
AND CLASSICALLY DEVELOPING CHROMATOGRAMS

A description is given of two appliances for preparing chromatograms.

The first apparatus (a chromatographic drum) allows a simple and rapid preparation of circular chromatograms. The apparatus is rendered very useful and efficient by the extremely simple system of fixing the chromatographic sheet, the ease of positioning the initial spots of bands and the speed with which successive affusions of solutions to be chromatographed may be dried.

The second apparatus, which comes into the class of « small chromatographic instruments » facilitates the preparation of ascending one- and two-dimensional chromatograms, used mainly in laboratories carrying out general chromatographic analyses, and is a simplified version of the all-purpose apparatus proposed in 1960. Improvement of the latter has been brought about as a result of new developments incorporated in both types of apparatus described.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLOCK R., DURRUM E., ZWEIG G., 1958. *A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, 2^e ed. 37.
- BOOTH V., 1961. Solvent evaporator for paper chromatography. *J. Chromatogr.*, **6**, 95.
- BOULANGER H., BISERTE G., 1959. Chromatographie de partage sur papier. In LEDERER E. *Chromatographie en chimie organique et biologique*, **1**, 215.
- CRAMER F., 1957. *Papierchromatographie*, 53. Verlag Chemie, Weinheim Bergstr.
- DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960. Appareil permettant la pose facile et le séchage rapide et simultané de plusieurs taches ou bandes de départ sur les chromatogrammes. *Ann. Techol. agric.*, **9**, 409.
- GANIS M., 1961. A sample evaporator for paper chromatography. *J. Chromatogr.*, **5**, 84.
- HELMANN M., 1956. Papierchromatographie in PAECH K., TRACEY M. *Moderne methoden der Pflanzenanalyse*, **1**, 127 Springer Verlag, Berlin, Gottingen-Heidelberg.

- KAWERAU E., 1956. *Chromatographic methods*, **1**, n° 2, 7-8.
- LEDERER E., LEDERER M., 1953. *Chromatography. A Review of principles and application*, 88. Elsevier Publishing Co, Amsterdam.
- LISKENS H., 1959. *Papierchromatographie in der Botanik*, 18. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- MCKIBBINS, HARRIS J., SAEMAN J., 1961. A sample applicator for chromatographic paper and its use for 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and levulinic acid analysis. *J. Chromatogr.*, **5**, 207.
- PEYRON L., 1958. Chromatographie à développement radial. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, n° 6, 889.
- PEYRON L., 1961. Applications de la chromatographie radiale à l'étude analytique des composés naturels. *Chim. Anal.*, **43**, 364.
- RUNGE F., 1922. Dissertation, Berlin.
- RUNGE F., 1850. Zur Farbenchemie Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Maler, etc. Berlin.
- RUNGE F., 1855. Die Bildungstriel der Stoffe, Oranienburg.
- RUTTER L., 1948. A modified technique in filter-paper chromatography. *Nature*, **161**, 435.
- RUTTER L., 1950. Some applications of a modified technique in paper-chromatography. *Analyst*, **75**, 37.
-

LE RÔLE DES ENZYMES PÉCTOLYTIQUES DU RAISIN OU DE PRÉPARATIONS COMMERCIALES DANS LE PROCESSUS DE LA ELABORATION DES JUS

G. MARTIN, L. SCHER, C. DEPIERRE

Centre de Recherches Agronomiques, Centre de Recherches Technologiques de l'Institut National de la Recherche Scientifique
Laboratoire de Biochimie, Université de Montpellier, Montpellier (France)

Le Directeur-Gérant: M. L. CAGNAC

Impression Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 22-10-1963.

Dépôt légal: 4^e trimestre 1963. N° d'impression: 1068.

INTRODUCTION

Les applications technologiques des enzymes pectolysantes sont bien connues

et leur utilisation est en constante augmentation. Elles sont de plus en plus répandues dans l'industrie alimentaire, notamment dans la fabrication des jus de fruits.

Les auteurs ont étudié le rôle des enzymes pectolysantes dans le processus de la fabrication des jus de raisin. Ils ont comparé l'efficacité de ces enzymes avec celle de préparations commerciales.

Les résultats obtenus montrent que les enzymes pectolysantes jouent un rôle important dans la clarification des jus de raisin.

LE RÔLE DES ENZYMES PECTOLYTIQUES DU RAISIN OU DE PRÉPARATIONS COMMERCIALES DANS LE PROCESSUS DE LA CLARIFICATION DES JUS ⁽¹⁾

G. MARTEAU, J. SCHEUR, C. OLIVIERI

*Station de Technologie agricole, Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École nationale supérieure agronomique, Montpellier (Hérault)*

SOMMAIRE

Si beaucoup de résultats d'ordre technologique ont mis en évidence le rôle des enzymes pectolytiques dans la clarification des jus de fruits, peu de travaux se sont encore appliqués à relier l'efficacité des résultats obtenus au contenu enzymatique du milieu. Compte tenu du progrès des connaissances fondamentales dans ce domaine, les auteurs se sont efforcés de déceler le rôle respectif dans le processus de la clarification, d'une part de la pectine-estérase et d'autre part de plusieurs types de poly-galacturonases.

Dans la 1^{re} partie de cette étude, il est montré le rôle des enzymes du raisin, limité par la faiblesse des activités du type endo-P.G.

Dans la 2^e partie, est envisagé le cas des préparations commerciales dont la limite d'efficacité semblerait plutôt au contraire conditionnée par leur teneur en pectine-estérase.

INTRODUCTION

a) *Les applications technologiques des enzymes pectolytiques*

Les applications technologiques des enzymes pectolytiques sont bien connues et depuis longtemps, notamment dans l'industrie des jus de fruits, s'est répandu l'usage de préparations commerciales généralement d'origine fongique.

Une abondante littérature dont nous ne mentionnerons que quelques références (CRUESS et al., 1951 ; REED, 1955 ; MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1962 ; MANZONI, NICONI, 1953 ; YANG, THOMAS, WIEGANG, 1950 ; MARTAKOV, MOLDABAEV, 1962), signale les nombreux avantages résultant du traitement des jus par ces produits. Le but recherché est essentiellement l'obtention d'une clarification plus rapide,

⁽¹⁾ Cette étude a été réalisée en partie avec des moyens accordés par la Délégation générale de la Recherche scientifique et technique (convention n° 62. F. R. 096).

s'accompagnant d'une diminution de la viscosité des jus, et aussi d'une amélioration marquée de leur aptitude à subir la filtration.

Il semble cependant que l'on néglige trop souvent le rôle joué par les enzymes naturelles du fruit pouvant conduire plus lentement à des transformations identiques, ce qui justifie que les produits commerciaux soient utilisés aussi précocement que possible.

Dans le cas du raisin, on gagne un avantage considérable à les ajouter dans la vendange foulée avant même l'extraction du jus, de manière à bénéficier de la facilité accrue de séparation du jus résultant de la dégradation cellulaire, elle-même probablement due à une activité enzymatique du type protopectinase (MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1961).

b) *Le stock enzymatique des préparations commerciales*

Les préparations commerciales généralement obtenues à partir d'un certain nombre de moisissures, ne sont jamais suffisamment purifiées pour ne laisser subsister que les enzymes pectolytiques proprement dites ; la présence dans diverses préparations d'amylase, de protéase, de cellulase, de xylanase, a notamment été signalée. REID (1950) en particulier décèle, en 1950, par chromatographie sur papier, la présence à peu près constante d'arabinose, de galactose, de xylose, parmi les produits d'hydrolyse enzymatique de polysaccharides de diverses origines ; ce phénomène pourrait jouer un certain rôle dans la diminution de viscosité des liquides naturels traités par les diastases commerciales. Un autre aspect important des actions secondaires des préparations pectolytiques commerciales, résulte de leur éventuelle activité oxydasique pouvant jouer un rôle défavorable, particulièrement du point de vue des modifications de couleur qu'elle peut rapidement occasionner sur les jus.

Mais quelles que soient ces actions secondaires, et notamment l'hydrolyse des polyholosides plus ou moins associés aux pectines, il est indiscutable que le phénomène essentiel en cause dans la clarification enzymatique des moûts et du vin par les diastases pectolytiques, demeure l'activité pectolytique elle-même.

Où en est-on actuellement dans la connaissance des enzymes pectolytiques ?

Quelques progrès ont été accomplis dans ce domaine au cours des 10 dernières années ; ils ont notamment conduit à une classification nouvelle des enzymes pectolytiques exposée dans l'excellente mise au point publiée en 1957 par DEMAÏN et PHAFF, qui ne semble pas avoir été mise en cause dans les quelques travaux parus depuis sur ce sujet (DESHPANDE, 1960 ; PATEL, PHAFF, 1959, 1960 ; ALBERSHEIM, NEUKOM, DEUEL, 1960 ; TUTTOBELLO, MILL, 1961 ; MILL, TUTTOBELLO, 1961).

En ce qui concerne la pectine méthyl-estérase (P.E), l'enzyme catalysant l'hydrolyse des groupements méthoxyles de la pectine, transformant cette dernière en acide pectinique puis en acide pectique, il ne semble pas que des connaissances nouvelles soient venues compléter notablement ce que l'on sait déjà depuis longtemps.

Par contre, des connaissances nouvelles, aident à mieux comprendre maintenant le mécanisme de la dégradation de la grosse molécule pectique par l'attaque de la liaison glucosidique 1-4 reliant chacun des maillons de la chaîne polygalacturonique. Cette dégradation était autrefois attribuée à une seule enzyme d'abord appelée « pectinase » puis polygalacturonase (P.G).

On distingue actuellement 2 types d'enzymes P. G, conduisant l'attaque de deux façons différentes :

1) Celles qui, attaquant la liaison glucosidique en un point quelconque de la chaîne pectique, scindent très rapidement la molécule en de nombreux fragments et provoquent de la sorte une chute très rapide de la viscosité ; dans ce cas, la vitesse d'attaque devient nulle ou extrêmement lente lorsque le stade des acides tri- et digalacturoniques est atteint.

2) Un deuxième type de polygalacturonase attaque la liaison glucosidique à l'extrémité de la molécule pectique. Dans ces conditions, la libération des groupements réducteurs ne modifie que lentement la taille des molécules et ne s'accompagne donc pas d'une diminution rapide de la viscosité. L'acide galacturonique constitue le terme normal de la dégradation.

Les enzymes du premier type sont désignées par le préfixe « endo » ; celles du deuxième type par le préfixe « exo ».

Si l'attaque est spécifiquement réalisée sur l'acide pectique de préférence à la pectine, on distingue :

l'endopolygalacturonase et l'exopolygalacturonase.

Lorsqu'au contraire, le substrat de choix est constitué par la pectine non déméthoxylée, on distingue :

l'endopolyméthylgalacturonase et l'exopolyméthylgalacturonase.

Il semble bien que ce soient les deux premières enzymes attaquant spécifiquement l'acide pectique, qui soient les plus répandues et les plus sûrement caractérisées.

c) *Objet des recherches entreprises*

De nombreux travaux ont été consacrés à chacun des deux chapîtres que nous venons d'évoquer : d'un côté, des expérimentations nombreuses ont mis en évidence les conséquences pratiques, purement technologiques, de l'utilisation de préparations diastasiques commerciales ; d'autre part, des recherches nombreuses ont permis de mieux connaître l'action spécifique de telle ou telle enzyme, purifiée au maximum, agissant sur un substrat pectique, lui-même aussi pur et aussi bien défini que possible.

Entre ces deux sommes de connaissances, il y a un domaine encore assez peu exploré, celui qui devrait nous permettre d'exploiter nos connaissances fondamentales pour expliquer et donc pour diriger plus efficacement les effets technologiques souhaités.

L'objet du présent travail se situe dans ce domaine : nous nous proposons de rechercher une connaissance meilleure du mécanisme de la clarification du jus de raisin, en décelant la part revenant dans ce mécanisme, aux enzymes pectolytiques caractérisées appartenant soit au raisin lui-même, soit aux préparations commerciales d'origine fongique.

Comme pour toute étude relative à un milieu naturel, la tâche est compliquée :

1) du fait des variations de composition du substrat imposé par la nature, en particulier de la présence dans le raisin, à côté des pectines naturelles, d'autres polysides, également susceptibles, nous l'avons vu, de subir une dégradation enzymatique ;

2) du fait de la présence simultanée soit dans le raisin, soit dans les préparations commerciales, de plusieurs enzymes pectolytiques de spécificités différentes, mais

interférant les unes avec les autres. Une étude rigoureuse nécessiterait donc une séparation préalable de chaque enzyme susceptible d'agir pour en étudier le rôle spécifique, mais par cette voie, la solution des problèmes technologiques ne pourrait être que très lointaine.

La méthode que nous avons adoptée, moins analytique, peut apparaître moins rigoureuse et fait une large part à l'interprétation ; nous pensons cependant qu'elle peut conduire plus rapidement à des conclusions d'ordre technologique.

A ce dernier point de vue, le problème essentiellement posé est le suivant :

Peut-on déduire de la mesure des activités enzymatiques typiques du raisin ou des préparations commerciales ajoutées, l'aptitude du jus à être plus ou moins rapidement clarifié ?

Travaux déjà effectués.

1) *Clarification spontanée du jus de raisin.* — La présence d'enzymes pectolytiques dans le jus de raisin et leur participation à la clarification spontanée du jus de raisin et du vin nouveau est admise ou tout au moins envisagée depuis longtemps.

Dès 1934, MEHLITZ et SCHEUER montraient que la clarification évoluait parallèlement à l'hydrolyse enzymatique des pectines et à la diminution de viscosité qui en résulte. De même, la mise en liberté du méthanol, dès son extraction selon les observations de M. FLANZY, M^{lle} LOISEL de M^{me} BOUZIGUE (1958, 1959), implique la présence dans le jus, d'une pectine estérase.

Avec J. SCHEUR et C. OLIVIERI (1961) nous avons plus récemment essayé de préciser le mécanisme en cause et proposé une méthode de mesure de l'activité P. E. du raisin, dérivée de celle utilisée par P. JACQUIN (1955) dans le cas du cidre. Lors de nos premières expériences en 1960, nous avons toujours observé une clarification très rapide des jus, accompagnée d'une libération également rapide du méthanol, dont la dose atteignait un palier en moins de 48 h, mais ces expériences n'avaient porté que sur un nombre assez restreint d'échantillons et cela en fin de période de maturation. Les expériences relatées ci-dessous ont été poursuivies pendant toute la période de maturation du raisin, ce qui a présenté l'immense avantage de pouvoir observer des cas beaucoup plus divers.

2) *Clarification à l'aide de préparations commerciales.* — Bien des tentatives ont été faites pour essayer de relier l'efficacité technologique des préparations commerciales à leur contenu enzymatique. Nous avons dit plus haut les raisons pour lesquelles ce problème est difficile à résoudre ; les publications parues sur ce sujet, témoignent effectivement de ces difficultés :

H. W. BERG (1959) en particulier, n'a décelé aucune corrélation entre l'efficacité de 3 préparations commerciales différentes et leur contenu, soit en P. E. en soit P. G. ni avec le rapport de ces activités entre elles.

Avant lui, JOSLYN et ses collaborateurs (1952) avaient abouti à des conclusions identiques concernant le jus de pomme.

Cependant SHUBERT (1952) a montré que la teneur en pectine-estérase des préparations avait constitué en 1950 le facteur limite de leur efficacité en vue de la clarification du jus de pomme ; mais ces résultats n'auraient pas été confirmés en 1951.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — MÉTHODES DE DOSAGE

1) *Méthanol*

Nous avons utilisé la microméthode colorimétrique de P. JACQUIN et J. TAVERNIER (1953), qui nous avait donné entière satisfaction lors d'un précédent travail (MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1961).

2) *Matières pectiques*

Les diverses formes de matières pectiques ont été dosées par la méthode PEYNAUD en nous limitant le plus souvent à la détermination de la concentration en acide pectique libre et estérifié ; cependant, afin de pouvoir multiplier les mesures sans avoir à utiliser de trop grandes quantités d'alcool, la première précipitation des matières pectiques a été réalisée par l'acétone à 60 p. 100 en milieu chlorhydrique et non plus par l'alcool à 80°.

B. — PRÉPARATION DES SUBSTRATS

Acide pectique

Nous avons préparé de l'acide pectique par déméthoxylation de la pectine utilisée par ailleurs comme substrat ; la saponification est assurée par la soude en milieu alcoolique, selon la technique décrite par MORTERN et COLE (1939).

Le produit séché sous vide après lavage à l'alcool et à l'éther, manifeste une assez grande difficulté à être remis en solution.

Des solutions aqueuses à 0,5 p. 100 ont cependant pu être obtenues : à cet effet, le produit mis en suspension dans l'eau à 40° - 50° et soumis à une intense agitation, est maintenu à pH 4-5, par des additions convenables de lessive de soude. Une fois la solubilisation achevée, le pH est exactement ajusté à pH 4,0 par addition d'acide citrique.

C. — MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

Pectine estérase (P.E)

a) *Moûts*. — Nous avons appliqué aux moûts la technique à laquelle nous nous étions arrêtés lors de notre précédent travail (MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1961).

Le substrat est constitué par une solution à 0,5 p. 100 de pectine (degré d'estérification 72 p. 100) dans un tampon citrate, phosphate 0,1 M. pH 5 ; 25 ml de jus ajusté à pH 5 sont additionnés à 50 ml de ce substrat, après incubation en présence de ClNa dans les conditions que nous avons précisées. L'hydrolyse est conduite à 40° et le méthanol dosé périodiquement selon la technique JACQUIN et TAVERNIER (1953).

L'activité P.E est définie par la pente en début d'hydrolyse de la courbe de libération du méthanol en fonction du temps ; cette courbe demeure sensiblement une droite pendant une très longue période.

Selon les besoins, nous exprimons l'activité soit en mg de méthanol libéré par ml de jus et par heure, soit en méq de fonction ester hydrolysée par ml de jus et par heure.

b) *Produits enzymatiques*. — La même technique a été utilisée, mais sans incubation préalable du produit en présence de ClNa ; le produit commercial est ajouté au substrat, après avoir été mis en solution dans un tampon citrate-phosphate pH 5.

Activités P.G

1) *Mesure de la vitesse de libération des groupements réducteurs.* — Le substrat est constitué soit par une solution de pectine (degré d'estérification 72 p. 100) dans un tampon acide citrique phosphate disodique 0,1 M pH 4, soit par une solution d'acide pectique dont nous avons décrit plus haut la préparation. L'activité est mesurée par dosage des groupements réducteurs apparus à 30° en présence de la préparation étudiée préalablement solubilisée dans le tampon pH 4. Nous avons adopté la technique de dosage des groupements réducteurs de H. S. OWENS et coll., rapportée par KERTESZ. (Oxydation par l'iode en présence de $\text{CO}_3 \text{Na}_2$).

L'activité enzymatique est définie par la pente en début d'hydrolyse de la courbe de libération des groupements réducteurs en fonction du temps ; cette courbe demeure une droite en début d'hydrolyse ; il en a toujours été ainsi tant que les fonctions réductrices apparues n'ont pas dépassé 20 p. 100 des liaisons glucosidiques hydrolysables. Dans ces conditions, la proportionnalité entre l'activité et la quantité de produit enzymatique mis en œuvre est vérifiée dans de larges limites.

Les activités sont exprimées en milli-équivalents de groupements réducteurs libérés par heure et par mg de produit mis en œuvre. Nous n'avons appliqué cette technique qu'à l'étude des préparations enzymatiques commerciales ; la figure 1 montre, dans le cas de l'un de ces produits, l'allure de l'hydrolyse pour chacun des substrats envisagés.

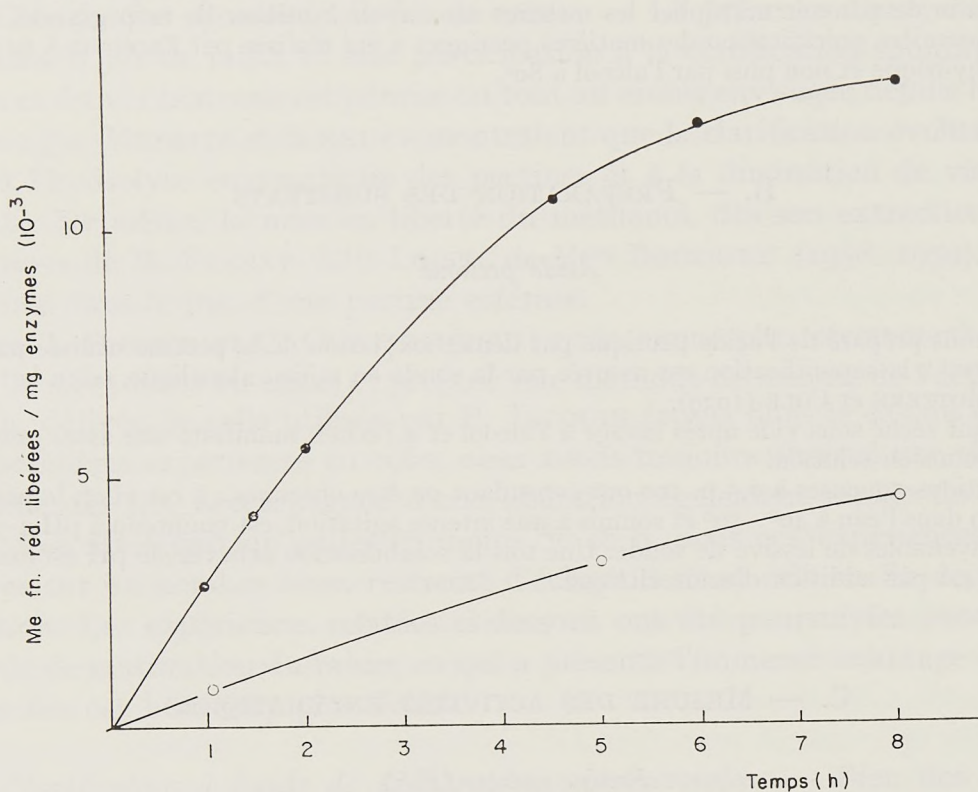


FIG. 1. — *Allure de la libération des fonctions réductrices en fonction du temps (produit C).*

- Substrat acide pectique 0,5 p. 100 ; pH 4,0,
 - Substrat pectine 0,5 p. 100 dans tampon phosphaté 0,1M ; pH 4,0.
- Température 30°.

2) *Mesures de l'abaissement de viscosité (activité type endopolygalacturonase).* — Nous avons utilisé comme substrat pour la mesure de cette activité : soit une solution de 0,5 p. 100 de pectine (72 p. 100 de degré d'estérification), dans un tampon acide citrique — phosphate disodique 0,1 M à pH 4 — soit une solution d'acide pectique à 0,5 p. 100 ajustée à pH 4 et obtenue dans les conditions précédemment exposées. L'activité endo P. G. était évaluée en fonction de l'abaissement de viscosité de substrat provoqué par la solution enzymatique à pH 4,0 et à 30°.

a) *Cas des produits enzymatiques commerciaux.*

La quantité nécessaire pour chaque détermination, de l'ordre de 100 mg, est mise en solution dans 10 ml de tampon pH 4 et portée à 30°. Pour les produits comportant un support insoluble, la suspension est maintenue environ 1 heure à 30° de façon à permettre la solubilisation complète de

l'enzyme. La suspension est alors mélangée à 100 ml du substrat amené à 30° et ce mélange est immédiatement admis dans le tube central d'un viscosimètre de Haake à chute de bille après tamisage sur filtre en verre fritté. La température du liquide à l'intérieur du tube est maintenue constante à 30°, par circulation dans la double enveloppe du viscosimètre, d'eau rigoureusement maintenue à cette température par un thermostat très sensible. Un simple retournement du viscosimètre autour d'un axe horizontal permet des mesures très fréquentes, du temps de passage d'une bille de verre entre deux repaires; ce temps, proportionnel à la viscosité, est mesuré par un chronomètre au 1/10 de seconde.

Appelons :

V_o — Le temps de chute de la bille (en seconde) dans le substrat additionné de l'enzyme nactivé par la chaleur.

V_t — Le temps de chute dans le mélange en activité à un temps donné.

V_s — Le temps de chute dans le liquide obtenu par mélange de l'enzyme inactivée et du solvant sans pectine.

L'expression $A = \frac{V_o - V_t}{V_o - V_s} \times 100$ représente le p. 100 de chute de viscosité relative du substrat, au bout d'un temps t d'action enzymatique.

La valeur de A rapportée à 1 mg d'enzyme dans 1 ml de substrat devient :

$$A_1 = A \times \frac{V}{P}$$

V — Volume du liquide en incubation en ml.

P — Poids d'enzyme en mg.

L'activité enzymatique recherchée est définie par la pente en début d'hydrolyse de la courbe exprimant les variations de A_1 en fonction du temps; nous verrons au cours de la discussion qui suit, dans quelle mesure cette courbe est une droite; tant qu'il en est ainsi, nous pouvons exprimer l'activité par la valeur $\frac{A_1}{t}$ (t représentant le temps d'hydrolyse en minutes).

b) Cas des jus.

La même technique est utilisée, mais dans ce cas, 50 ml du jus préalablement ajusté à pH 4,0 et amené à 30°, sont additionnés aux 100 ml de substrat de pectine tamponnée.

Dans ce cas :

$$A_1 = A \frac{V}{v}$$

V — Volume du liquide en incubation en ml.

v — Volume de jus ajouté.

Discussion concernant la méthode de mesure de l'activité P.G par la mesure de l'abaissement de viscosité du substrat.

Quelle est la façon la plus souhaitable d'exprimer l'activité du type endo P.G en fonction de l'abaissement de viscosité d'une solution de pectine ou d'acide pectique?

Les limites d'efficacité de la méthode ont été mises en évidence notamment par RIED (1949).

La chute de viscosité relative telle qu'elle est exprimée par l'expression $A = \frac{V_o - V_t}{V_o - V_s} \times 100$, n'est pas une fonction linéaire du temps, sauf en tout début d'hydrolyse.

Les méthodes exprimant l'activité endo-P.G en fonction du temps nécessaire pour atteindre une valeur de A fixée à l'avance (le plus souvent 50 p. 100) présentent donc à notre avis une incertitude incontestable.

Il en est évidemment de même, des méthodes exprimant l'activité par la valeur de A atteinte au bout d'un temps t d'hydrolyse fixé à l'avance.

La précision des mesures peut être améliorée par l'emploi d'une préparation enzymatique de référence d'activité connue ou par une standardisation poussée du substrat pectique utilisé et des conditions expérimentales de la mesure.

Divers auteurs (KIESER, POLLARD, STONE, 1949) ont vérifié dans ces conditions une relation linéaire entre la chute de viscosité et log de la concentration enzymatique.

Par contre, très récemment, P.J. MILL et TUTTOBELLO (1961) notent une proportionnalité directe entre la concentration en enzyme et l'inverse du temps nécessaire pour obtenir une valeur de A égale à 50 p. 100.

Nous avons jugé préférable, quant à nous, d'établir pour la mesure de chaque activité, la courbe représentant les variations de A en fonction du temps et, comme nous l'avons dit plus haut, d'ex-

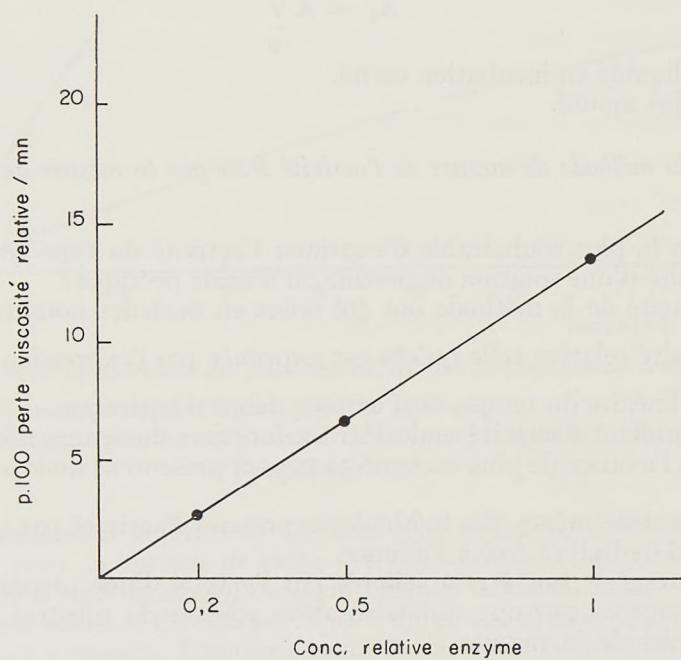
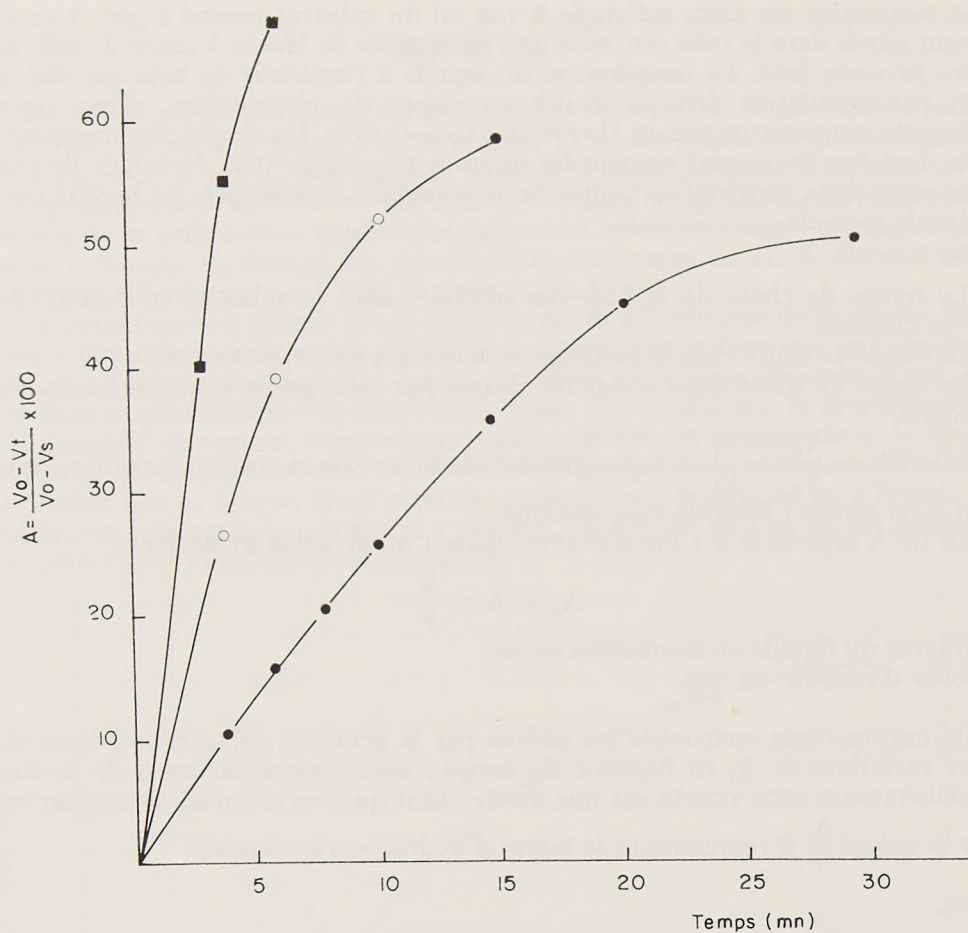


FIG. 2. — Influence du temps d'hydrolyse et de la dose d'enzyme sur l'abaissement de viscosité relative du substrat :
acide pectique 0,5 p. 100, pH 4,0, température 30°.

- 40 mg de produit commercial dans 100.
- 100 mg de produit commercial dans 100.
- 200 mg de produit commercial dans 100.

primer l'activité endo-P.G par la pente de cette courbe en tout début d'hydrolyse mesurée pendant la courte période où cette courbe peut être assimilée à une droite.

Les exemples suivants (fig. 2) montrent que nous obtenons dans ces conditions, une proportionnalité très satisfaisante entre la quantité d'enzyme et l'activité telle que nous l'exprimons. Nous pensons qu'il en est ainsi pour autant que la quantité d'enzyme utilisée pour chaque essai soit telle que le pourcentage de perte de viscosité relative par minute demeure dans des limites comprises entre 2 p. 100 et 15 p. 100.

Pour la plupart des produits testés ces conditions étaient remplies pour une concentration de 100 mg de produit dans 100 ml de substrat.

CLARIFICATION SPONTANÉE DU JUS DE RAISIN : RELATIONS ENTRE LES TRANSFORMATIONS PECTOLYTIQUES ET LA VITESSE DE CLARIFICATION SPONTANÉE

I. — RÉSULTATS

A. — *Allures de la libération du méthanol dans le jus de raisin*

Divers échantillons de jus de raisin provenant de plusieurs cépages et cueillis à divers états de maturité, ont été stabilisés par addition de benzoate de Na (1,5 g/l) et conservés à la température du laboratoire.

Le méthanol a été dosé dans chaque échantillon, dès après le foulage et à intervalles convenables en cours de conservation.

A titre d'exemple, nous avons reproduit sur la figure 3, les courbes relatives à des jus provenant de vendanges de *Carignan*, récoltées en 1962 à divers états de maturité.

Ces courbes manifestent des allures assez variables, le méthanol étant parfois libéré très rapidement, surtout au moment où la maturité est atteinte.

Parfois au contraire, la libération est très lente surtout au cours des premiers jours, une accélération intervenant cependant avant que le palier final ne soit atteint.

a) *Relation avec l'état de maturité.*

A quelques exceptions près (fig. 3) (tabl. 1), la libération du méthanol est d'autant plus rapide que l'état de maturité est plus avancé.

b) *Influence de la macération.*

La figure 4 montre l'évolution de la teneur en méthanol pour divers échantillons de jus de muscat, séparés de la vendange foulée après des durées variables de contact avec cette dernière (1961).

Il est manifeste que, pendant sa durée, la macération provoque un accroissement notable de la vitesse de libération du méthanol ; cependant, dès que le jus est séparé des matériaux solides de la vendange, cette vitesse diminue et la phase linéaire de libération du méthanol faisant suite à la macération, se développe à une vitesse peu influencée par la durée de cette dernière.

Le palier finalement atteint est d'autant plus important que la macération a été plus longue conformément aux conclusions que nous avons déjà eu l'occasion de développer dans une précédente publication (MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1961).

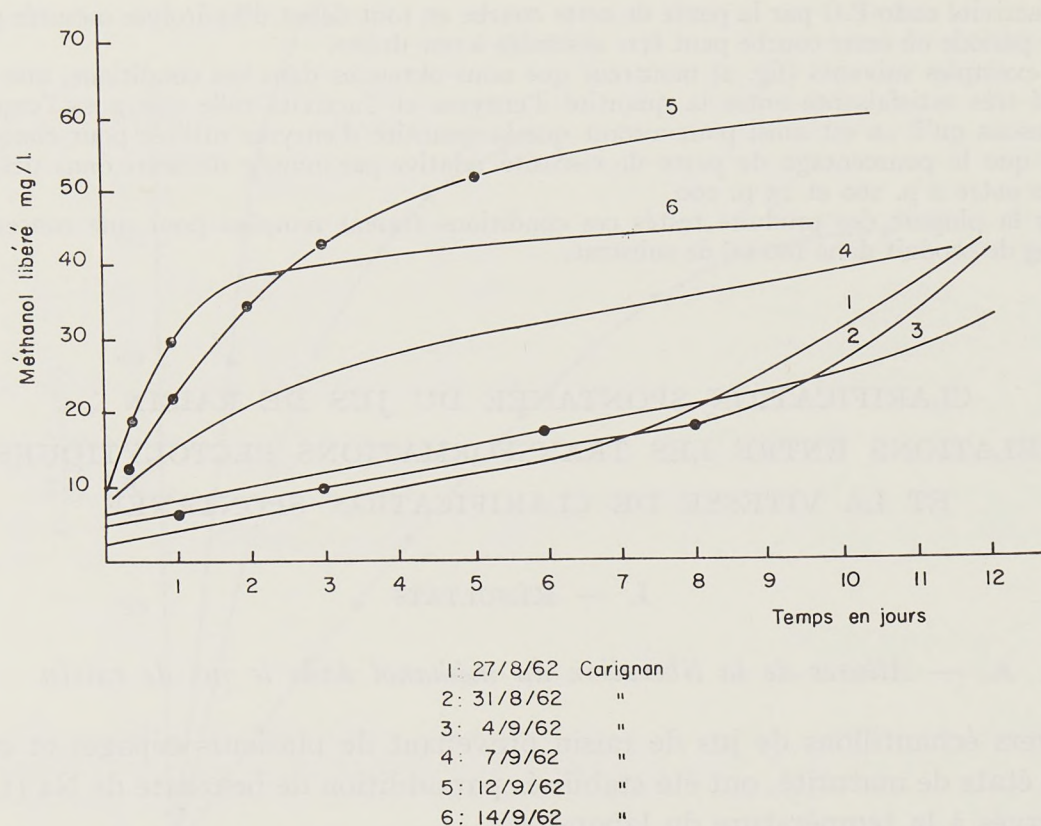


FIG. 3. — *Allure de libération du méthanol dans des moûts de Carignan récoltés à diverses dates. Échantillons stabilisés en benzoate de soude (1,5 g/l), abandonnés à la température ambiante.*

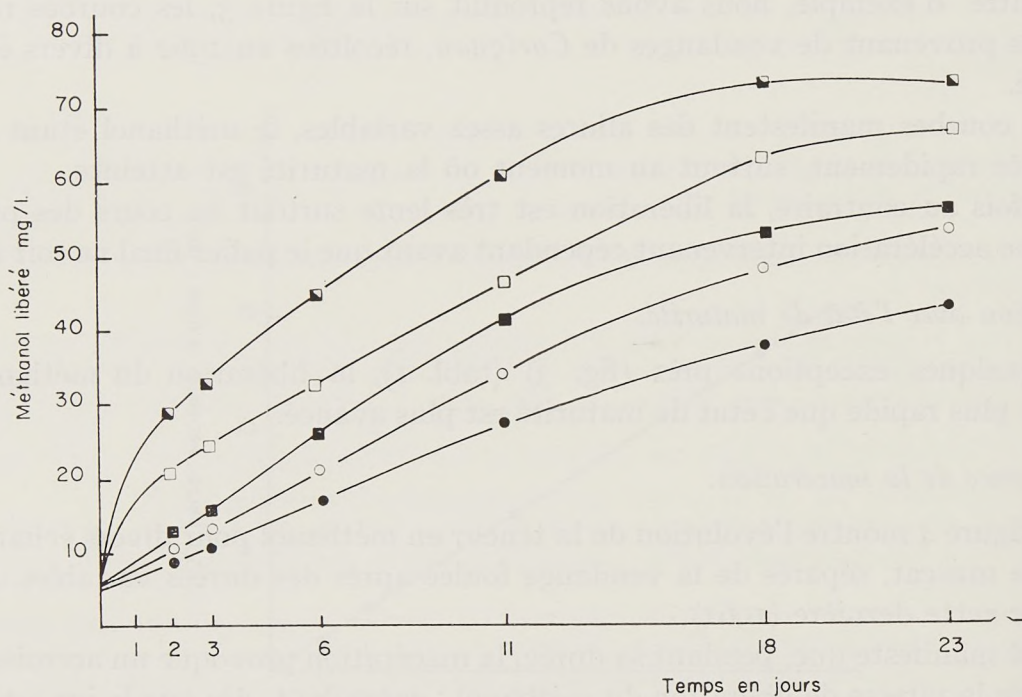


FIG. 4. — *Influence de la macération sur la vitesse de libération du méthanol : Vendange de Muscat (1961).*

Activité PE

- 0 022 ● Évolution du jus séparé dès après le foulage.
 - 0 019 ○ Évolution du jus ayant macéré 1 h au contact des matières solides.
 - 0 020 ■ Évolution du jus ayant macéré 4 h au contact des matières solides.
 - 0 018 □ Évolution du jus ayant macéré 24 h au contact des matières solides.
 - 0 019 ■ Évolution du jus ayant macéré 48 h au contact des matières solides.
- (Dans tous les cas, les temps sont comptés à partir du foulage).

c) *Relation avec la vitesse de clarification spontanée du jus.*

La confrontation des colonnes 1 et 2 du tableau 1 montre très nettement que la clarification spontanée des jus est d'autant plus rapidement atteinte que la vitesse de libération du méthanol est plus grande.

Le processus de clarification spontanée des jus est donc étroitement lié à la déméthoxylation enzymatique des pectines naturelles.

TABLEAU I

Échantillons	Délai de clarification	Méthanol libéré dans le jus (mg/l)	Activité P. E. du jus ⁽¹⁾	% de perte de viscosité relative du jus par minute	Activité endo P. G. + P. M. G. du jus ⁽²⁾
29/8 Carignan	+ de 15 j	1,33	0,020	0,005	traces
31/8 Carignan	10 j	2,0		0,012	
10/9 Carignan	+ de 7 j	2,25	0,105	0,0062	0,045
4/9 Carignan	6 j	2,6	0,105	0,016	0,11
25/9 Carignan	3 j	4,5	0,035	0,080	0,087
1/10 Carignan	3 j	5,0	0,030	0,046	
12/9 Carignan	1 j	15,3	0,018	0,050	0,27
14/9 Carignan	— de 24 h	25,0		0,14	0,43
6/10 Carignan	— de 24 h	25,0	0,020		0,38
19/9 Aramon	3 h	28,5	0,037	0,18	0,54
26/9 Muscat.....	+ de 7 j	8,5	0,019	0,060	

⁽¹⁾ Exprimée en mg de méthanol libéré à 40° par ml de jus et par heure à partir d'une solution de pectine à 5,0 p.100 tamponnée à pH 5.

⁽²⁾ Exprimée par l'abaissement relatif de viscosité provoqué à 30° par ml de jus et par minute, à partir d'une solution de pectine à 0,5 p. 100 tamponnée à pH 4.

d) *Relation avec l'activité P. E. du jus.*

Nous avons dosé, pour chaque jus expérimenté, l'activité pectine-estérase, dans une solution de pectine à 0,5 p. 100, selon la méthode mentionnée plus haut.

Les résultats figurent dans la colonne 3 du tableau 1. Si quelques résultats font défaut dans ce tableau, c'est qu'ils n'ont pu être obtenus en temps voulu, la nature de l'étude entreprise nécessitant la réalisation d'un grand nombre de déterminations expérimentales dans un laps de temps très court.

Il résulte nettement cependant, de la confrontation des colonnes 2 et 3 du tableau 1, qu'aucune corrélation ne permet de relier l'activité P. E. des jus, à la vitesse de libération du méthanol dans ces derniers. Nous essaierons plus loin d'expliquer cette anomalie.

B — *Évolution de la viscosité des jus de raisin*

Parallèlement à l'étude précédente, chaque échantillon utilisé en vue de suivre la libération du méthanol et la clarification, a subi, en cours de conservation, le contrôle de sa viscosité.

L'évolution de cette dernière en fonction du temps, a été exprimée en pourcentage d'abaissement de viscosité relative, valeur dont nous avons expliqué plus haut le mode de calcul.

Chaque fois que le temps nous l'a permis, nous avons également mesuré, pour chaque échantillon, l'activité enzymatique responsable, exprimée en pourcentage d'abaissement de viscosité relative provoquée par minute et par ml de jus, sur une solution de pectine à 0,5 p. 100 tamponnée à pH 4,0. Nous appelons arbitrairement cette activité « activité endo (P.G. + P.M.G.) », puisqu'elle englobe, comme nous l'avons vu, la possibilité d'une action conjuguée de l'endopolygalacturonase et de l'endopolyméthylgalacturonase.

Les valeurs obtenues figurent dans le tableau 1, colonnes 4 et 5.

Les constatations suivantes peuvent être faites :

- 1) L'abaissement de viscosité observé dans les jus, à part une exception (jus du 4/9), varie dans le même sens que l'activité enzymatique mise en cause ;
- 2) Cette activité endo (P.G. + P.M.G.), et donc la vitesse d'abaissement de la viscosité du jus lui-même, est nettement liée à la vitesse de clarification spontanée du moût ; il est indéniable que les moûts à clarification lente diminuent très lentement leur viscosité, tandis que les moûts à clarification rapide subissent une diminution accélérée de cette dernière.

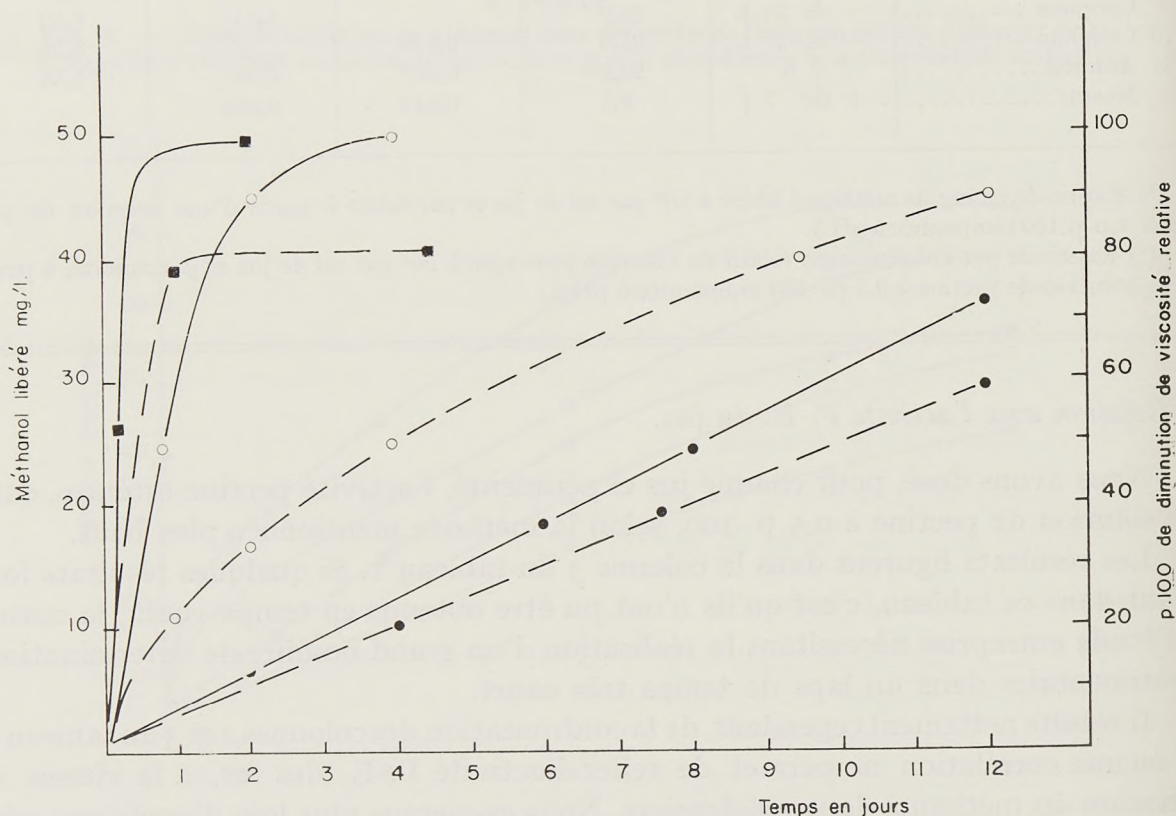


FIG. 5. — Évolution comparée de la libération du méthanol (— — —) et de la diminution de la viscosité relative (—).

- — ● — — ● Carignan du 29/8 (non clarifié au bout de 15 jours).
- — ○ — — ○ Carignan du 1/10 (clarifié en 3 jours).
- — ■ — — ■ Aramon du 19/9 (clarifié en 3 heures).

La figure 5 précise l'allure du phénomène : les courbes montrent l'évolution de la viscosité et de la teneur en méthanol, dans 3 échantillons différant nettement les uns des autres par leur aptitude à la clarification.

Dans le cas des échantillons 2 et 3, cette dernière est intervenue pour un abaissement de viscosité relative de 90 à 95 p. 100 c'est-à-dire peu de temps avant que la viscosité n'atteigne sa valeur limite. Dans le cas de l'échantillon n° 1, la clarification n'était pas encore intervenue au bout de 15 jours, mais au bout du 12^e jour, l'abaissement de viscosité relative n'était encore que de 70 p. 100.

En ce qui concerne le méthanol, sa vitesse de libération évolue, nous l'avons vu, dans le même sens que la vitesse d'abaissement de la viscosité.

Notons cependant que la clarification intervient bien avant que la dose de méthanol n'ait atteint sa valeur limite.

II. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons noté que la vitesse de clarification spontanée du jus est d'autant plus élevée que la déméthoxylation des pectines du moût par la pectine estérase du raisin intervient plus vite. Mais, ce qui semble paradoxal à première vue, cette vitesse de libération du méthanol ne semble pas dépendre de la quantité de pectine estérase du milieu, mais au contraire de l'activité enzymatique du type endopolygalacturonique qui provoque l'abaissement de viscosité du jus.

C'est lorsque la viscosité est proche d'atteindre sa valeur limite que la clarification intervient.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous avons d'abord envisagé la présence dans le moût d'un inhibiteur de la pectine-estérase, du type par exemple de ceux probablement de nature tannoïde, récemment décelés dans la feuille de vigne (BELL, ETCHELLS, 1961).

La corrélation constatée depuis entre la libération du méthanol dans le jus et l'abaissement de la viscosité nous a conduit à envisager une hypothèse plus vraisemblable.

Elle résulte des observations faites en 1945 par LINEWEAVER et BALLOU, selon lesquelles, lors de la dégradation de la pectine, l'acide pectique libre formé inhiberait l'action ultérieure de la pectine-estérase, par formation avec cette dernière, d'un complexe inactif ; cette action inhibitrice ne se manifesterait pas aux pH élevés et pourrait être diminuée aux bas pH par une élévation suffisante de la concentration en cations telle qu'elle existe dans le substrat pectique tamponné utilisé pour les mesures d'activité.

Nous pouvons donc facilement imaginer que le mécanisme inhibiteur se manifeste particulièrement aux pH bas du jus de raisin et du vin et qu'il n'est supprimé que dans la mesure où l'acide pectique est, au fur et à mesure de sa formation, rapidement dégradé par l'endopolygalacturonase du raisin.

Cette action synergique de la P.E. et de la polygalacturonase a d'ailleurs été démontrée dès 1945 sur un substrat artificiel par F. JANSEN, P. MAC DONNEL et R. JANG (1945).

CLARIFICATION DU JUS DE RAISIN
PAR LES PRÉPARATIONS PECTOLYTIQUES COMMERCIALES.
RÉSULTATS TECHNOLOGIQUES, MÉCANISMES D'ACTION

Nous avons expérimenté en 1962, 7 préparations commerciales de diverses origines que nous désignerons par les lettres A à G ; les préparations F et G nous sont parvenues trop tardivement pour pouvoir être soumises à des essais d'ordre technologique.

I. — RÉSULTATS

1) *Efficacité technologique des produits commerciaux*

Nous avons eu la possibilité, pendant la période des vendanges de 1962, de comparer l'efficacité technologique des produits A, B, C, D et E.

Chacun des produits a été ajouté à raison de 0,5 g/kg. à des lots identiques de 3 kg de vendange de Carignan. L'addition des préparations commerciales était faite dès après le foulage.

Dans une expérience, l'égouttage des lots de vendange foulée a été réalisé au bout de 2 heures de contact avec les matières solides.

Dans une autre expérience, l'égouttage a été réalisé après 5 heures de contact en présence des matières solides.

Les contrôles suivants ont été réalisés :

- 1) mesure de l'écoulement des jus de goutte ;
- 2) évolution de la teneur en pectine et en méthanol de ces derniers ;
- 3) évolution de leur viscosité ;
- 4) évolution de leur filtrabilité.

TABLEAU 2

	Produits				
	A	B	C	D	E
Macération 2 h	106	108	110	102	101
Macération 5 h	105	114	121	107	109

Volumes de jus de goutte écoulés au bout d'une heure rapportés à 100 pour la vendange témoin non traitée, égouttée immédiatement après foulage.

a) *Aptitude des jus à être séparés des matières solides.*

Nous avons utilisé pour effectuer cette mesure, le dispositif déjà décrit dans une précédente publication (MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1962), constitué par un enton-

noir de 5 litres à l'intérieur duquel est maintenu par une armature métallique circulaire, un filet de forme conique de maille carrée de 5 mm.

Le tableau 2 marque une efficacité nettement plus accentuée pour la préparation C et à un moindre degré pour la préparation B.

b) *Évolution de la teneur en pectine et en méthanol des jus.*

Les résultats du tableau 3 montrent la diminution rapide du taux de pectine intervenant sous l'action des préparations commerciales. Vingt-quatre heures après traitement, la teneur en pectine est devenue pratiquement nulle tandis qu'il faut attendre près de 5 jours pour obtenir un résultat identique dans le témoin non traité.

TABLEAU 3

	Temps écoulé à partir du foulage	Acide pectique libre (gr/l)	Acide pectique estérifié (gr/l)	Pectine totale (gr/l)
Témoin.....	2 h	0,114	0,342	0,456
	22 h	0,102	0,146	0,248
	5 j	0,004	0,019	0,023
Produit A	2 h	0,088	0,256	0,344
	22 h	0,004	0	0,004
Produit B	2 h	0,07	0,228	0,298
	22 h	0,009	0,005	0,014
Produit C	2 h	0,017	0,114	0,131
	22 h	0,009	0,014	0,023
Produit D	2 h	0,097	0,266	0,363
	22 h	0,008	0,00	0,008
Produit E	2 h	0,107	0,266	0,373
	22 h	0,013	0,052	0,065

Par ailleurs, la figure 6 montre l'allure de la libération du méthanol dans le jus témoin et dans les jus provenant des échantillons traités par chacun des produits expérimentés.

Notons que dans le cas des jus traités, le taux de pectine précipitable par l'acétone et l'alcool, devient pratiquement nul, avant que le méthanol n'atteigne sa valeur limite.

Les produits B et C, surtout le premier, se classent encore en tête tant du point de vue de la vitesse de destruction des pectines que de la vitesse de libération du méthanol ; le classement des produits vis-à-vis de cette dernière s'établit comme

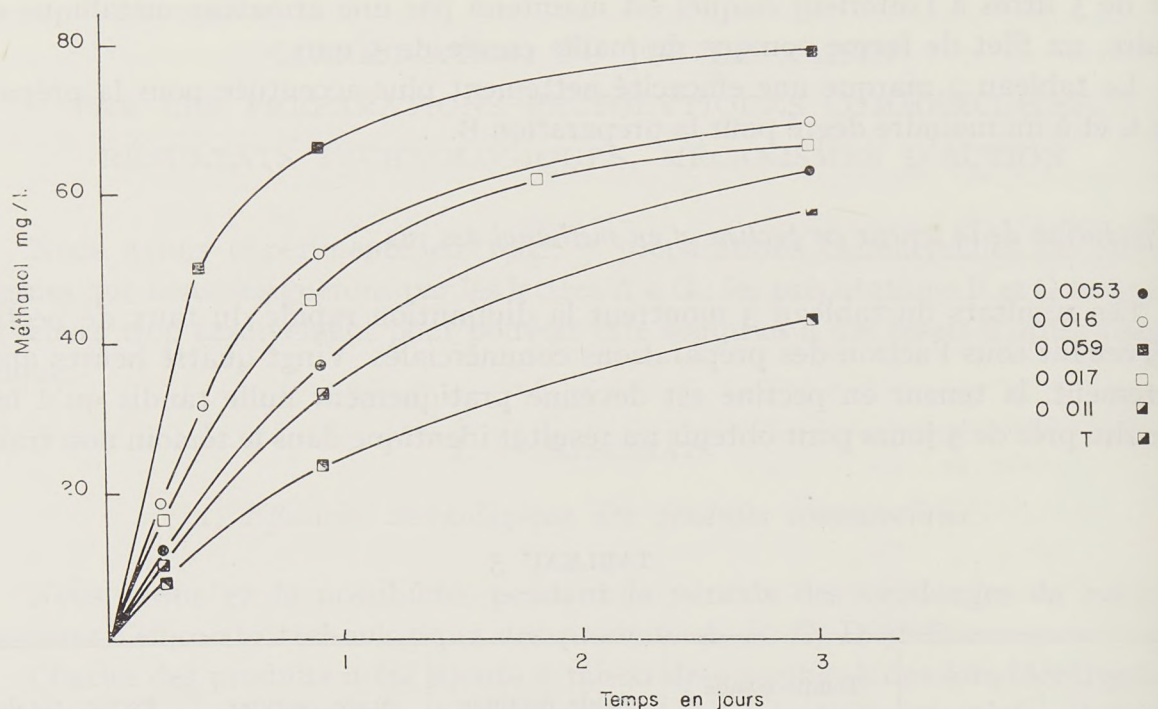


FIG. 6. — Libération du méthanol au cours de la clarification des jus traités par les enzymes pectolytiques. Activité PE (mg de méthanol libéré par mg de produit et par heure). Pectine 0,5 p. 100 ; pH 5,0 ; T 40°.

TABLEAU 4
*Pourcentage de perte de viscosité
par rapport à la perte totale subie au cours de la clarification*

Temps écoulé à partir du foulage	2 heures (%)	22 heures (%)	5 jours (%)	5 heures (%)	27 heures (%)	5 jours (%)
Témoin (1)	9,3	75	100			
	2 heures de macération			5 heures de macération		
Produit A	72	96	100	65	88	100
Produit B.	73	100	100	86	94	100
Produit C	100	100	100	100	100	100
Produit D	68		100	84	97	100
Produit E	59	92	100	75	89	100

(1) Séparé dès après le foulage
0,5 g de chaque produit ajouté par kg de vendange foulée.

celui des activités P.E (fig. 6) ; le produit A fait cependant exception, libérant le méthanol plus vite que le produit E, d'activité P.E supérieure.

c) *Évolution de la viscosité des jus.*

Le tableau 4 montre l'évolution de la viscosité du jus témoin et du jus provenant des lots de vendange traitée par les différents produits, respectivement après 2 heures et 5 heures de macération.

Nous rappelons, ce que nous avons déjà signalé à propos de la clarification spontanée des jus : cette dernière intervient lorsque l'abaissement de viscosité relative représente environ 90 à 95 p. 100 de l'abaissement total. C'est encore ce que nous avons constaté après addition de préparations commerciales, mais dans ce cas, la clarification étant intervenue dans un temps très court et ne représentant pas un phénomène instantané, il ne nous est pas possible d'en fixer le délai par un nombre, avec une précision suffisante.

Le classement des produits à ce point de vue se situe dans le même ordre que précédemment, à l'exception, à nouveau, du produit A, dont l'efficacité relative semble diminuer après une longue macération (5 h) au contact de la matière solide.

d) *Évolution de l'aptitude des jus à la filtration.*

Nous avons suivi l'évolution de la filtrabilité de chaque échantillon de jus, en mesurant la quantité de jus obtenu dans un temps fixé, dans les conditions standardisées que nous avons précisées dans la précédente publication déjà citée en référence.

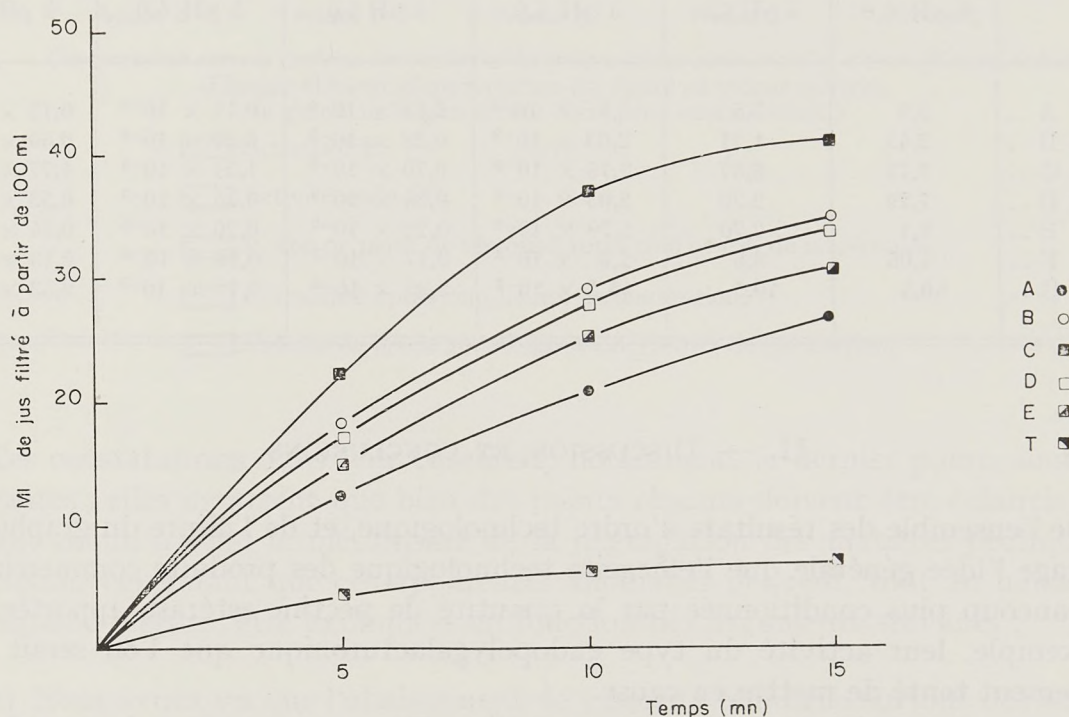


FIG. 7. *Épreuve de filtration : macération cinq heures.*

L'allure des filtrations est précisée dans la figure 7 relative aux échantillons ayant subi 5 heures de macération au contact des matières solides.

Le classement des produits s'établit comme celui vis-à-vis de l'abaissement de viscosité.

2) *Bilan des activités pectolytiques des préparations étudiées*

Le bilan des activités de chacune des préparations dont nous disposons a été établi vis-à-vis de deux types de substrats : tout d'abord une solution de pectine de pomme dont la proportion de groupements carboxyles estérifiés était de 66,7 p. 100,

soit du même ordre de grandeur que celle observée pour la pectine naturelle du raisin, au moment où le jus est extrait.

Nous avons aussi utilisé comme substrat, une solution d'acide pectique à la même concentration. Le tableau 5 précise l'ensemble de ces activités.

TABLEAU 5

	Abaissement de viscosité relative provoquée à 30° par mg de préparation et par minute		Fonctions réductrices libérées à 30° me par mg de préparation et par heure		Fonctions « ester » hydrolysées à 30° me par mg de préparation et par heure	Fonctions « ester » hydrolysées à 40° me par mg de préparation et par heure
	Substrat : Ac. pectique à pH 4,0	Substrat : pectine à pH 4,0	Substrat : Ac. pectique à pH 4,0	Substrat : pectine à pH 4,0	Substrat : pectine à pH 4,0	Substrat : pectine à pH 5,0
Produit A ..	3,9	3,5	$2,4 \times 10^{-3}$	$0,28 \times 10^{-3}$	$0,14 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-3}$
Produit B ..	2,43	1,21	$2,03 \times 10^{-3}$	$0,28 \times 10^{-3}$	$0,30 \times 10^{-3}$	$0,50 \times 10^{-3}$
Produit C ..	2,75	6,07	$2,76 \times 10^{-3}$	$0,70 \times 10^{-3}$	$1,31 \times 10^{-3}$	$1,77 \times 10^{-3}$
Produit D ..	7,29	2,70	$2,03 \times 10^{-3}$	$0,34 \times 10^{-3}$	$0,35 \times 10^{-3}$	$0,53 \times 10^{-3}$
Produit E ..	8,1	2,70	$1,79 \times 10^{-3}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,20 \times 10^{-3}$	$0,34 \times 10^{-3}$
Produit F ..	4,05	3,6	$2,0 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-3}$
Produit G ..	40,5	40,5	$45,5 \times 10^{-3}$	$2,25 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$2,53 \times 10^{-3}$

II. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

De l'ensemble des résultats d'ordre technologique, et de l'allure du graphique 8 se dégage l'idée générale que l'efficacité technologique des produits commerciaux a été beaucoup plus conditionnée par la quantité de pectine-estérase apportée, que par exemple, leur activité du type endopolygalacturonique que l'on serait assez logiquement tenté de mettre en cause.

Une seule expérience est évidemment insuffisante pour tirer des conclusions générales et bien d'autres seront nécessaires, dans des conditions variées, pour aboutir à de telles conclusions. Il sera particulièrement utile de s'adresser à des jus de divers types du point de vue de leur propre stock enzymatique.

Le phénomène est cependant suffisamment net pour que nous tentions d'en trouver l'explication dans les résultats du tableau 5 précisant l'importance des divers types d'activité enzymatique susceptibles d'intervenir.

Les constatations suivantes peuvent être faites :

a) L'abaissement de viscosité relative (col. 1 et 2) dont peuvent être responsables soit l'endopolygalacturonase après déméthoxylation du substrat par la P. E, soit l'endopolyméthylgalacturonase, intervient parfois notablement moins vite sur la pectine que sur l'acide pectique, mais parfois aussi à la même vitesse.

b) Des différences beaucoup plus nettes sont observées entre les deux types de substrats, en ce qui concerne la vitesse de libération des groupements réducteurs (col. 3 et 4) qui intervient beaucoup plus lentement sur la pectine que sur l'acide pectique.

c) Que les substrats soient constitués par la pectine ou par l'acide pectique déméthoxylé, aucune proportionnalité ne se manifeste nettement entre la vitesse d'abaissement de la viscosité relative et la vitesse de libération des fonctions réductrices.

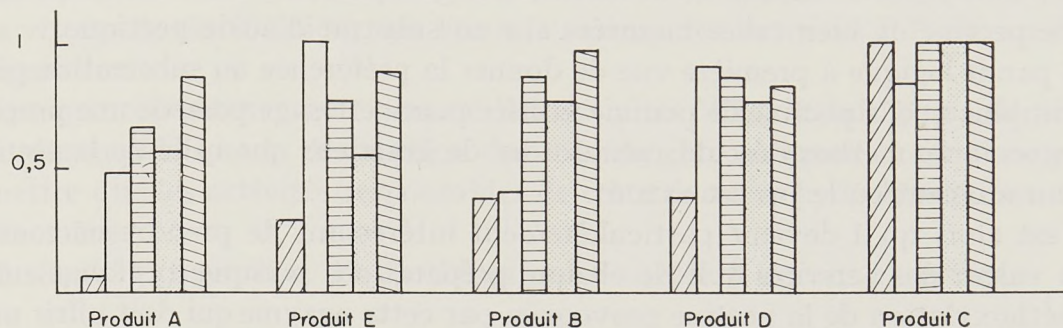


FIG. 8. — Comparaison entre le contenu enzymatique des préparations commerciales et leur efficacité technologique. (Chaque élément d'appréciation est figuré en valeur relative, la grandeur la plus élevée étant prise comme unité.)

▨ Activité PE.

□ Activité endo PG.

▨ P. 100 de perte de viscosité après cinq heures de macération

▨ Filtrabilité après cinq heures de macération.

▨ Volume de jus de goutte après cinq heures de macération.

Ces constatations dans leur ensemble, notamment le dernier point, sont assez décevantes ; elles montrent que bien des points obscurs doivent être éclaircis avant que soit connu à fond le mécanisme de la dégradation des matières pectiques.

Notons cependant que ces apparentes anomalies peuvent, tout au moins dans une certaine mesure, être expliquées en fonction des arguments suivants :

1) Nous avons vu que l'abaissement de viscosité témoigne surtout des activités du type endo P.G ou endo P.M.G tandis que l'apparition des fonctions réductrices peuvent aussi résulter des activités du type exo P.G ou exo P.M.G. Les préparations étudiées peuvent fort bien différer sensiblement les unes des autres, dans les rapports qu'elles offrent entre ces deux groupes d'activité.

2) L'abaissement de viscosité, comme nous l'avons déjà vu, est un phénomène intervenant très rapidement au début, pendant les toutes premières minutes de la pectolyse ; à tort ou à raison, nous avons précisément défini l'activité enzymatique à ce point de vue, par l'allure de la réaction pendant cette période initiale.

Au contraire, la libération des fonctions réductrices est un phénomène beaucoup plus progressif, pouvant éventuellement manifester son effet dans la phase la plus lente d'évolution de la viscosité.

Or, nous avons déjà vu que la clarification intervient précisément dans la phase

ultime d'évolution de la viscosité, lorsque le pourcentage d'abaissement de cette dernière atteint 90 à 95 p. 100.

Quoiqu'il en soit, et compte tenu de cette remarque, puisque les renseignements fournis par la mesure de l'abaissement initial de viscosité ne sont pas exactement conformes à ceux résultant du dosage des groupements réducteurs, nous serons logiquement tentés d'accorder une plus grande valeur à ces derniers plutôt qu'aux premiers, pour juger de la valeur technologique des produits commerciaux.

La question se pose alors de savoir si les activités enzymatiques à prendre en compte, sont celles résultant de la mesure des groupements réducteurs sur un substrat de pectine ou bien celles mesurées sur un substrat d'acide pectique.

Il paraît logique à première vue de donner la préférence au substrat de pectine, d'autant plus que la pectine de pomme utilisée pour cet usage possède une proportion de groupements méthoxylés du même ordre de grandeur que celle de la pectine du raisin au moment où le jus est extrait.

C'est alors qu'il devient particulièrement intéressant de prendre en considération la valeur des activités P.E de chaque préparation, puisque typiquement c'est la déméthoxylation de la pectine provoquée par cette enzyme qui doit offrir un substrat valable à l'action ultérieure des polygalacturonases.

Les activités P.E (dernière colonne du tableau 5) témoignent de variations assez importantes.

Notons particulièrement que le classement des produits vis-à-vis de cette activité, coïncide avec le classement de la colonne 4, exprimant la vitesse d'attaque de la liaison glucosidique de la pectine ; le produit A fait cependant exception.

Il nous a paru intéressant de mesurer simultanément la vitesse d'hydrolyse de la fonction ester et celle de la liaison glucosidique, pour le même substrat de pectine à pH 4,0 et à 30° (col. 5).

Dans le cas des produits A et F, la liaison glucosidique est attaquée nettement plus vite que la liaison ester ; il est probable que ces produits possèdent des enzymes du type polyméthylgalacturonique. Dans le cas du produit C au contraire, c'est la fonction ester qui est attaquée nettement plus vite que la fonction glucosidique.

Enfin, pour les quatre autres préparations, il est particulièrement intéressant de noter que l'attaque de la liaison glucosidique est pratiquement effectuée à la même vitesse que l'hydrolyse de la fonction ester. Il paraît alors logique d'admettre que dans ce cas, l'hydrolyse de la liaison glucosidique, subordonnée à la déméthoxylation préalable de la pectine, soit freinée par une insuffisance de pectine-estérase dont la dose constitue un facteur limite. C'est donc l'activité P.E qui réglerait dans ce cas, la vitesse de dégradation de la molécule.

Nous avons vu que les résultats technologiques semblent confirmer ce rôle fondamental de la pectine-estérase dans le cas des préparations commerciales.

Action conjuguée des enzymes du raisin et des enzymes fongiques.

Nous avons constaté que, dans le cas du jus de raisin livré à lui-même, la vitesse de clarification semblait réglée par son activité du type endopolygalacturonique, cette dernière paraissant constituer un facteur limite.

Dans les préparations commerciales, tout au moins dans certaines d'entre elles, c'est au contraire la faiblesse de l'activité P.E qui semble limiter la manifestation complète de l'activité P.G.

Que se passe-t-il lorsque les enzymes du raisin et les enzymes fongiques conjuguent leurs effets ?

Il est permis de supposer que le grand excès d'activité du type endopolygalacturonique apporté par les préparations commerciales est de nature à faire cesser le mécanisme inhibiteur de la pectine estérase du raisin.

Or cette activité est loin d'être négligeable ; elle est du même ordre de grandeur que celle apportée par les diastases fongiques, aux doses habituelles d'emploi.

Dans le cas par conséquent où, compte tenu de cette sommation des effets, l'activité P.E. résultante constitue encore un facteur limite, il est logique d'admettre que la vitesse de clarification, soit liée à la somme des activités P.E. du raisin et de la préparation.

Lorsque cependant, cette somme des activités P.E. conduit à une déméthoxylation plus rapide que la destruction des liaisons glucosidiques, il est alors possible d'admettre que les activités responsables de cette dernière hydrolyse puissent régler le phénomène.

Il s'agit là cependant d'hypothèses qui demeurent encore à vérifier.

Reçu pour publication en juillet 1963.

SUMMARY

THE ROLE OF GRAPE PECTOLYTIC ENZYMES AND OF COMMERCIAL PREPARATIONS IN THE CLARIFICATION OF GRAPE JUICE

After having referred very briefly to the technological use of pectolytic enzymes, the authors discussed the complexity of the enzyme content of commercial preparations (the eventual technological role of the enzymes which hydrolysed gums and oxidases).

In discussing recent progress in the knowledge of pectolytic enzymes the distinction now made between endopolygalacturonase (or endopolymethylgalacturonase) and exopolygalacturonase (or exopolymethylgalacturonase) was emphasized.

The following conclusions were reached on the role played by pectolytic enzymes, either of the grape itself or of commercial fungal preparations, in the mechanism of grape juice clarification.

Spontaneous clarification :

1. There was a direct correlation between the speed of clarification and that of methanol liberation in the juice ;
2. These two phenomena did not appear to be connected with the amount of pectin-esterase in the juice, but to the latter's endopolygalacturonic activity : clarification taking place when the viscosity of the juice was lowered towards its limiting value ;
3. The above-mentioned facts seemed to indicate that pectin-esterase activity was slowed down in the juice by an inhibiting mechanism linked with the presence of unreduced free pectic acid.

Clarification by commercial pectolytic preparations :

1. The technical value of 5 commercial preparations had been tested for the following criteria :
 - the ease of separating the juice from solid matter,
 - the development of the pectin and methanol contents of the juice ;
 - the development of the viscosity of the juice,
 - the development of the filtering properties of the juice.These preparations were usually classified according to their P. E., rather than their endo-P. G. type, activity ;
2. It was further ascertained that several preparations, when added to a substrate of apple pectin at pH 4, attacked the glucoside liaison and the ester function at the same speed. This suggested that, in the case of these preparations, the P. E. activity might constitute a limiting factor to the reduction of natural pectin ;
3. It was expected that the large excess of endopolygalacturonic type activity brought about

by commercial preparations would cause the pectin-esterase inhibitor mechanism of the grape to cease functioning.

If this should prove to be the case, the sum of the P. E. activities of the grape and the preparations could in a certain number of cases be the conditioning agent of technological efficiency.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERSHEIM, NEUKOM, DEUEL, 1960. Sur la formation de produits de dégradation insaturés par une enzyme dégradant les pectines. *Helv. Chim. Acta*, **5**, 43.
- BELL T. A., ETCHELLS J. L., 1961. Probable identity of the pectinase inhibitor in grape leaves. *J. Food Sci. U. S. A.*, **6**, 600-5.
- BERG H. W., 1959. The effects of several fungal pectic enzyme. Preparations of grapes musts and wines. *Am. J. Enol. Vit.*, **10**, 130-34.
- CRUESS W. V., O'NEAL R., CHONG G., UCHIMOTO D., 1951. The effect of pectic enzymes in wine making. *Am. Soc. Enol. Proc.*, 59-75.
- DEMAIN A. L., PHAFF H. J., 1957. Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. *Wallerstein Lab. Comm.*, **20**, 119.
- DESHPANDE, 1960. Studies on the pectolytic enzyme system of *Rhizoctonia solani*. IV. Viscosity reducing enzymes. *Enzymologia*, **22**, 295-306.
- FLANZY M., LOISEL Y., 1958. Évolution des pectines dans les boissons et production de méthanol. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 311.
- FLANZY M., BOUZIGUES L., 1959. Pectines et méthanol dans les moûts de raisin et les vins. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 59.
- JACQUIN P., TAVERNIER J., 1953. Microdosage colorimétrique du méthanol. Application aux cidres et aux eaux-de-vie de cidre. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 113.
- JACQUIN P., 1955. Pectine méthylestérase et matières pectiques dans la pomme et la poire, leur importance dans la fabrication des cidres et des poirés. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 67.
- JANSEN E. F., MAC DONNELL L. R., JANG R., 1945. Simultaneous actions of polygalacturonase and pectine esterase in pectine. *Arch. Biochem.*, **8**, 113.
- JOSLYN M. A., MIST S., LAMBERT E., 1952. The clarification of apple juice by fungal pectic enzyme preparations. *Food Technol.*, **6**, 133-39.
- KERTESZ Z. I., *Methods in Enzymology*, Colowick and Kaplan, **1**, 163.
- KIESER M. E., POLLARD A., STONE A. M., 1949. The clarification of apple juice (II). *Ann. Report. Hort. Rest. Sta. Long Ashton*.
- LINWEAYER H., BALLOU G. A., 1945. The effect of cations on the activity of alfalfa pectinesterase. *Arch. Biochem.*, **6**, 373.
- MANZONI G., NICONI C., 1953. Emploi des enzymes en vinification. *Riv. Viticolt. Enol.*, **6**, 268.
- MARTAKOV A. A., MOLDABAEV R. K., 1962. Préparations enzymatiques pour la clarification du moût obtenu au moyen de presses continues. *Vinodelie Vinogr.*, **2**.
- MARTEAU G., SCHEUR J., OLIVIERI C., 1961. Cinétique de la libération enzymatique du méthanol au cours des transformations pectolytiques du raisin. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 161-183.
- MARTEAU G., SCHEUR J., OLIVIERI C., 1962. Les diastases pectiques. Essais de traitement de vendanges par préparation diastasique commerciale. *Ann. École nat. Agr. Montpellier*, **30**, 51.
- MEHLITZ A., SCHEUR M., 1934. *Biochem. Z.*, **268**, 345.
- MILL P. J., TUTTOBELLO, 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger* (II). *Biochem. J.*, **79**, 57.
- MOTTERN H. H., COLE H. L., 1939. *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2701. (d'après KERTESZ Z. I. (« The pectic substances », Interscience Publishers, New York, 1951).
- PATEL, PHAFF H. J., 1959. On the mechanism of action of yeast endopolygalacturonase on oligalacturonides and their reduced and oxidised derivatives. *J. Biol. Chem.*, **234**, 237-41.
- PATEL, PHAFF H. J., 1960. Properties of purified tomato polygalacturonase. *Food Res.*, **25**, 47-57.
- REED G., 1955. Recent investigations of pectic enzymes and their application in wine making. *Am. J. Enol.*, **6**, 17-24.
- REID W. W., 1949. *Proc. first Int. Congress Biochem.*, Cambridge, 287.
- REID W. W., 1950. The enzymatic degradation of pectin and others polysaccharides. *J. Food Agric.*, **1**, 234.
- SCHUBERT E., 1952. L'action de la pectinase sur le jus de pommes et les solutions de pectine. *Schweiz. Brauerei-Rundsch.*, **63**, 95-101.
- TUTTOBELLO, MILL P. J., 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger* (I). *Biochem. J.*, **79**, 51.
- YANG H. Y., THOMAS G. E., WIEGANG E. H., 1950. The application of pectic enzymes to berry and Concord wines. *Wines and Vines*, **31**, 77.

DÉTECTION DES FERROCYANURES ET DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE DANS LES JUS DE RAISIN ET LES VINS AU MOYEN DE LA RÉACTION DE MOIR

L. DEIBNER et J. MOURGUES

avec la collaboration technique de P. BARDOU

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

La détection de l'acide cyanhydrique libre et combiné sous forme de ferrocyanure de potassium, apparaissant dans les vins et les jus de raisin à la suite de leur deferrisation imparfaite, constitue un problème œnochimique important.

Parmi les solutions proposées, l'emploi du réactif de MOIR, mélange d'acétates de benzidine et de cuivre, n'a pas été étudié de manière suffisante dans le passé malgré son intérêt analytique certain.

Les recherches effectuées ont montré, entre autres, les particularités de la réaction colorée, l'influence des différentes substances perturbatrices sur sa stabilité et ont abouti à la mise au point d'un procédé de séparation et de détection de l'acide cyanhydrique total, basé sur son entraînement, en milieu acide porté à l'ébullition, par un courant d'air et sa fixation sous forme de cyanure de baryum à l'aide d'une solution saturée d'hydroxyde de baryum.

I. — INTRODUCTION

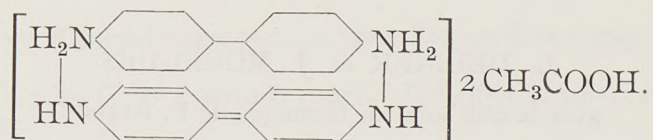
Parmi les nombreux réactifs qui donnent des colorations diverses avec l'acide cyanhydrique, celui proposé en 1910 par MOIR et employé par KOTCHERGA (1949) pour la détection des ferrocyanures dans les vins méritait des études systématiques en vue de son utilisation plus large en œnochimie analytique.

En faisant agir l'acide cyanhydrique en présence de l'acétate de cuivre sur l'hydrocœrulignone (le tétraméthoxy 3, 3', 5, 5' dihydroxydiphényle 4, 4'), MOIR a observé la formation d'une coloration orange en solution diluée due à la formation de la cœrulignone (la tétraméthoxy 3, 3', 5, 5' diphénoquinone 4, 4').

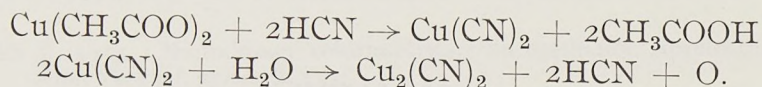
Malgré la sensibilité élevée de la réaction colorée (1/500 000), son utilisation n'est pas commode en raison de l'instabilité du réactif. La benzidine (*p*-diamidobiphényle) convient mieux malgré son défaut d'être moins sensible : $2 \cdot 10^{-7}$ (BRUN, 1932), $10^{-4,3}$ (WENGER, DUCKERT, RUSCONI, 1946), FEIGL (1953).

On connaît la propriété de la benzidine de fournir, par oxydation, des colorants bleus qui sont des composés mériquinoniques dans lesquels la liaison entre deux cycles est réalisée par des valences secondaires comme pour les quinhydrone (CRAMER, 1941). Comme on le sait, une mériquinone est un composé sans oxygène dont la configuration électronique ressemble à celles d'une quinone.

Dans le cas de la benzidine la formule du colorant bleu est la suivante (en milieu acétique).



En présence de l'anion cyanhydrique le potentiel rédox du cation cuivrique, utilisé sous forme d'acétate, augmente ; ce qui permet à ce cation d'oxyder la benzidine en colorant mériquinonique. Comme on le sait, le cation cuivrique seul ne peut produire cette réaction :



En 1913, PERTUSI et GASTALDI ont étudié les réactions de MOIR avec l'hydrocœrulignone et la benzidine et ont trouvé que ce dernier réactif permet de déceler jusqu'à 7 microgrammes d'acide cyanhydrique dans un volume de 10 ml, le virage étant fait à la teinte bleue.

Comme test microchimique, la réaction colorée à la benzidine-acétate de cuivre, a été utilisée par EMICH (cf. KOTCHERGA 1949), par BRUNSWIK (1921). Ce dernier a constaté que la sensibilité du réactif est très élevée, de l'ordre de 0,02 microgrammes d'acide cyanhydrique. D'ailleurs SEIFERT (1955) a décrit l'utilisation de cette réaction dans l'analyse des plantes, malgré son caractère non spécifique. En effet, de nombreux oxydants tels que les halogènes, les acides nitreux, nitrique etc., provoquent la formation du colorant mériquinonique. D'autre part, les réducteurs inhibent la réaction et en premier lieu il faut citer l'acide sulfureux.

En 1921 SIEVERTS et HERMSDORF ont appliqué la réaction à la benzidine-acétate de cuivre à la détection de l'acide cyanhydrique dans l'air ainsi que DECKERT (1930) qui décèle jusqu'à 4 microgrammes d'acide, cette quantité donnant une coloration faiblement bleue sur papier.

Contrairement aux constatations citées plus haut, BROCKELT et POHLOUDEK-FABINI (1958) considèrent le réactif à l'acétate de cuivre-benzidine comme peu sensible.

En ce qui concerne l'utilisation du réactif de MOIR, dans l'analyse œnochimique nous ne connaissons pas d'autres travaux sauf celui de KOTCHERGA (1949). MICONI (1952) le mentionne et explique son inutilisation par les difficultés de son emploi. D'ailleurs il attribue sa paternité à PERTUSI et GASTALDI (1913).

Dans sa thèse, soutenue en 1940, concernant la théorie du vieillissement du vin, KOTCHERGA a exposé les modalités de l'utilisation du réactif de MOIR pour la

détection des ferrocyanures dans les vins démétallisés à l'aide du ferrocyanure de potassium.

Ce mode opératoire a constitué le point de départ de nos recherches. Il est donc tout à fait naturel de donner sa courte description tout au début de l'exposé des conclusions auxquelles ont abouti nos études.

II. — PROCÉDÉ DE KOTCHERGA

A. — MODE OPÉRATOIRE

L'appareil est composé d'un ballon, dans lequel on introduit 100 ml de vin et 2 ml d'acide sulfurique à 10 p. 100, d'un réfrigérant ascendant de LIEBIG dont l'extrémité, courbée deux fois à l'angle droit, pénètre dans l'intérieur du récepteur relié à la trompe d'eau. Le récepteur reçoit 3-5 ml de réactif de MOIR. Le bouchon du ballon est traversé par un tube courbé touchant le fond du ballon. Son autre extrémité est munie d'un robinet pour régulariser le courant d'air, dont le débit est de l'ordre de 3-4 bulles par seconde, c'est-à-dire de 5-6 litres/heure.

Dès l'ébullition du liquide réactionnel, la couleur du réactif se modifie, de jaune citron elle devient verte, ensuite violette cramoisie et enfin bleue en fonction des quantités de l'acide cyanhydrique formé. Si au bout de 3-5 minutes la couleur du réactif reste sans changement, la réaction est considérée comme négative.

B. — SES DÉFAUTS

Malgré l'utilisation du réfrigérant ascendant, le courant d'air entraîne facilement l'alcool, les aldéhydes, les esters et l'anhydride sulfureux. Si la présence du premier ne constitue aucune gêne, par contre, les aldéhydes et les esters déterminent l'apparition d'un trouble masquant la coloration. En ce qui concerne l'anhydride sulfureux, il agit comme réducteur.

Dans ces conditions, sans la séparation préalable de ces substances, le mode opératoire de KOTCHERGA devient inopérant.

Cette circonstance nous a amené à effectuer depuis le mois d'août 1960, l'étude de tous les facteurs de la décyanuration des solutions et de la réaction colorée. Il est vrai que bien avant cette date nous avons employé sporadiquement cette réaction.

III. — RECHERCHES SUR LA SÉPARATION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE ET SA DÉTECTION A L'AIDE DU RÉACTIF DE MOIR A L'ACÉTATE DE CUIVRE—BENZIDINE

Dans ce qui suit nous exposerons successivement les données existantes et les résultats obtenus concernant la décyanuration des solutions, la décomposition des ferrocyanures, la fixation de l'acide cyanhydrique libéré, l'élimination des substances perturbatrices, les particularités de la réaction colorée, le mode opératoire de la technique de détection élaborée.

A. — SÉPARATION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

Les conditions optimales de la séparation de l'acide cyanhydrique dépendent de plusieurs facteurs et, en premier lieu, du mode d'extraction soit par entraînement au moyen d'un courant gazeux, soit par distillation à la pression atmosphérique ou sous vide.

La commodité et la rapidité de la distillation à la pression atmosphérique sont bien connues ainsi que ses inconvénients. L'avantage de la rapidité est contrebalancé par le volume du distillat et surtout par la présence de différentes substances perturbatrices. L'emploi du vide, même partiel, conditionne des pertes d'autant plus grandes que les rodages sont moins bons.

Déjà en 1927, BISHOP a montré que dans le cas des extraits des plantes, les meilleurs résultats sont fournis par le procédé d'entraînement à l'aide d'un gaz. En effet, le distillat contient davantage de substances apportant souvent des perturbations supplémentaires et, d'autre part, pendant la distillation, les risques de l'influence accrue des composés à carbonyle sont plus grands. LÜDTKE (1962) a confirmé les constatations et a montré les inconvénients de la distillation en présence de vapeur d'eau.

A notre connaissance, KOLTHOFF (1918) a été un parmi les premiers à étudier l'utilisation de l'entraînement par un gaz pour séparer l'acide cyanhydrique de ses solutions. BRUNSWICK (1923) a également utilisé le procédé d'entraînement par le gaz carbonique sans l'emploi du réfrigérant. MACH et FISCHLER (1924) ont cherché à améliorer le procédé de KOLTHOFF en faisant appel aux tubes capillaires afin d'obtenir une meilleure décyanuration des liquides.

Certes, l'entraînement par le courant de gaz demande beaucoup plus de temps et à la température ordinaire son efficacité dépend du type de l'appareil (réfrigérant, section des conduites, etc.). D'ailleurs les rodages de l'appareil doivent être bien sélectionnés afin d'éviter les pertes en acide cyanhydrique pendant toute la durée de l'opération.

1^o) Entraînement par courant gazeux

En œnochimie analytique l'utilisation de l'entraînement gazeux pour la séparation de l'acide cyanhydrique a été faite par MACH et FISCHLER (1924) suivant le procédé de KOLTHOFF (1918) amélioré et par BOSSELMANN (1924) qui a utilisé un appareil muni d'un réfrigérant ascendant en forme de sphère et le gaz carbonique, le dosage de l'acide cyanhydrique étant fait par l'argentimétrie. SALVAREZZA (1924) a employé la technique de BOSSELMANN pendant ses recherches sur le comportement de l'acide cyanhydrique dans les vins.

Au contraire, les procédés de CHELLE, DUBAQUIÉ et TURBET (1935), de WINKLER (1939) sont basés sur l'utilisation d'un courant d'air et d'une solution alcaline pour absorption de l'acide cyanhydrique.

L'application du procédé d'entraînement par le gaz à d'autres milieux, contenant de l'acide cyanhydrique a été effectuée par BOXER et RICKARDS (1951), par SERFASS et ses collaborateurs (1952), par LUDZACK, ALLAN MOORE, RUCHHOFT (1954).

Si BOXER et RICKARDS emploient de l'azote, les autres auteurs font appel à l'air et aux appareils dotés des réfrigérants ascendants.

Parmi les travaux œnochimiques récents, il faut noter ceux d'ALBONICO (1958) et de JAULMES et de MESTRES (1960, 1962). Le procédé italien est basé sur les enseignements de BOXER et RICKARDS (1951), mais utilise un réfrigérant, tandis que la technique de JAULMES et de MESTRES l'ignore, s'adressant uniquement aux solutions aqueuses de cyanures.

2°) Appareillage

Un bon appareil utilisé pour la séparation de l'acide cyanhydrique par l'entraînement à l'aide d'un gaz doit posséder un réfrigérant puissant renvoyant dans le ballon de réaction les substances condensables qui autrement devraient augmenter l'effet perturbateur des composés, plus volatils, apparaissant dans le récepteur à côté de l'acide cyanhydrique.

Les inconvénients du réfrigérant du type Liebig, employé par KOTCHERGA (1949) sont bien connus : le refroidissement insuffisant, l'espace trop restreint pour la circulation du gaz. Les réfrigérants à boules préconisés par SERFASS et ses collaborateurs (1952), par ALBONICO (1958) conviennent mieux, mais leur efficacité est moindre par rapport au réfrigérant de WEST à gros tube intérieur et à un réfrigérant à reflux sous forme d'un cylindre du type du condenseur HOPKINS (cf. A. WINTON, K. WINTON, 1947) utilisé dans l'appareil de FRIEDEMANN, COTONIO et SHAFFER (1927). En 1932 LIEB et ZACHERL ont mis au point un appareil plus perfectionné muni de bouchons rodés, d'un réfrigérant à double chemise et d'un absorbeur à plaques en verre poreux, de porosité 2, dont le tube d'amenée des gaz est soudé à celui du réfrigérant. Comme dans l'appareil de FRIEDEMANN et de ses collaborateurs, le tube d'amenée des gaz dans le ballon réactionnel ne touche pas son fond. Les dimensions de l'appareil de LIEB-ZACHERL sont assez modestes vu sa destination microchimique.

Nous avons fait construire un appareil de distillation (voir la figure 1) muni d'un réfrigérant à reflux de dimensions normales (de l'ordre de 22 cm pour la longueur utile et de 25 cm pour la longueur totale). L'air ou l'azote, pénétrant dans le ballon de 250 ml de capacité, 14, traverse préalablement une colonne remplie de chaux sodée et de chlorure de calcium (couche supérieure) et le flacon de garde 36 et ensuite trois absorbeurs à plaque, porosité n° 1, contenant successivement une solution de chlorure mercurique (HgCl_2) à 5 p. 100 destinée à retenir l'acide cyanhydrique de l'air, les substances aldéhydiques, une solution d'hydroxyde de sodium à 10 p. 100 et de l'eau distillée. Par précaution il est tout indiqué de doubler le nombre des absorbeurs à plaque. Dans ce cas on peut supprimer la colonne à chaux sodée.

Le tube de sortie 11 du réfrigérant 12 est relié au premier absorbeur à plaque (porosité N° 2) 7, réuni à son tour au deuxième absorbeur 3. Le premier absorbeur est plongé dans le mélange de glace et de l'eau glacée.

L'appareil de KOTCHERGA, décrit précédemment, diffère de notre appareil en ce que le tube de l'absorbeur est soudé au tube de la sortie du réfrigérant, ce qui permet d'éliminer les pertes dans le cas de notre appareil, elles sont à craindre en raison de l'existence des rodages sans lesquels le lavage et le nettoyage des plaques et des tubes d'amenée seraient impossibles.

La description complète de l'appareil sera donnée dans l'exposé du mode opératoire à la fin du mémoire.

Signalons que l'appareil de DESGREZ pour le dosage du carbone dans les substances organiques peut être utilisé à condition de munir le tube de sortie du réfrigérant à boules d'un rodage correspondant.

3°) La décyanuration et ses facteurs

Comme la désulfitation, la décyanuration des solutions dépend de plusieurs facteurs.

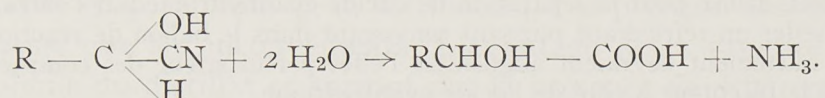
Sa réussite est conditionnée par les propriétés particulières de l'acide cyanhydrique.

1) Propriétés de l'acide cyanhydrique.

Tandis que l'anhydride sulfureux est un gaz très soluble dans l'eau, deux fois plus lourd que l'air, l'acide cyanhydrique appartient à la classe des liquides très volatils (P. E. 26,5°C). La volatilité de l'acide cyanhydrique est de 35 dans la solution aqueuse à la pression normale et dans la solution hydroalcoolique de 10° G. L.-20, 5 (JAULMES, MESTRES, HENRY 1958). Il est moins volatil que l'anhy-

dride sulfureux, 57, l'acétaldéhyde, 50, l'acétate d'éthyle, 53 (JAULMES 1951 p. 358).

Parmi les réactions de l'acide cyanhydrique il faut citer la formation de cyanhydrines, des nitriles, avec les aldéhydes et les cétones, du type $RCHOH-CN$. Ce sont des composés peu stables, facilement décomposables par un excès d'alcali avec régénération du cyanure et du corps à carbonyle (CORDIER, 1950). En présence d'acide minéraux les cyanhydrines subissent l'hydratation avec formation d'acide-alcool et d'ammoniaque (MONTAGNE, 1945).



Toutes ces réactions sont importantes sur le plan œnochimique.

2) Facteurs de décyanuration des solutions

Les principaux facteurs de décyanuration sont les suivants : la nature du gaz d'entraînement, son débit, la durée de l'entraînement, le volume du liquide, son pH et sa température.

En général, l'air ou l'azote sont utilisés le plus souvent compte tenu que les liquides de réception de l'acide cyanhydrique sont de nature alcaline pour lesquels l'emploi de l'acide carbonique n'est pas indiqué. En plus, le gaz carbonique comprimé des bouteilles est souvent souillé, surtout à la fin de leur service, par des substances réagissant avec le réactif de MOIR.

La purification de ce gaz, son contrôle, posent quelques servitudes complémentaires qui compliquent les opérations. Dans ces conditions, nous avons abandonné son utilisation.

La dispersion du gaz d'entraînement dans le liquide à décyanurer à l'aide d'un tube étiré ordinaire et d'une plaque en verre poreux produit le même effet à la température ordinaire comme l'ont constaté BOXER et RICKARDS (1951).

Personnellement, nous avons toujours employé le tube d'amenée du gaz dans le liquide de 4 mm de diamètre intérieur.

Quant au débit du gaz et la durée de son passage, ils se trouvent en liaison directe avec le volume du liquide à décyanurer et avec sa concentration en ion-hydrogène (pH).

Cette interdépendance n'a pas été toujours étudiée d'une manière systématique par différents auteurs. BRUNSWICK (1923) effectue la décyanuration à 30-40°, en présence du gaz carbonique, de 10 ml pendant 3 heures, sans réfrigérant ascendant. BISHOP (1927) soumet le volume de 100 ml à un courant d'air pendant 12 heures. MACH et FISCHLER (1924) et BOSSELMANN (1924) n'ont pas également donné des renseignements voulus. Par contre, CHELLE et ses collaborateurs (1935) précisent que la décyanuration de 100 ml de vin acidifié exige 3 heures pour un débit horaire d'air de l'ordre de 25-30 litres. Le procédé de WINKLER (1939) indique le débit d'air comprimé (48-60 litres/heure), mais non la durée d'aération du milieu fortement acidifié. LUDZACK, ALLAN MOORE et RUCHHOFT (1954) reprochent à la technique de SERFASS et de ses collaborateurs (1952) le manque de précisions sur la décyanuration complète des solutions. D'après ces auteurs, la décyanuration d'un volume de 250 ml exige 2 heures pour un débit de 4 litres/heure, étant donné qu'au bout d'une heure on récupère seulement 90,30 p. 100 d'acide cyanhydrique. En ce qui

concerne les concentrations en ion-hydrogène nécessaires pour une complète décyanuration, elles sont comprises entre les pH 2,5-9.

LUDTKE (1952) effectue la décyanuration de 50 ml à 40°C pendant 3 heures au moyen d'un courant d'azote ayant un débit de 13 litres par heure.

Mentionnons pour mémoire la constatation de CORDONNIER (1952) concernant l'entraînement de l'acide cyanhydrique dans les vins par un courant d'air (sans l'indication du débit), en absence du réfrigérant : on élimine 80 p. 100 d'acide dans 200 ml de vin au bout de 2 heures et demie.

Les études systématiques de la décyanuration à la température ordinaire (20-25°C) ont été effectuées par BOXER et RICKARDS (1951), sans l'utilisation du réfrigérant. L'efficacité du transfert de l'acide cyanhydrique dépend du volume de la solution, de son pH, du débit du gaz, de sa dispersion. Les enseignements obtenus se rapportent aux quantités d'acide cyanhydrique ne dépassant pas 0,5 microgrammes et à l'azote comme gaz d'entraînement.

Tout d'abord nous reproduirons les résultats concernant la relation entre les débits gazeux, les volumes des solutions à décyanurer et la durée de l'opération.

Les données du tableau I montrent que le recouvrement complet de l'acide cyanhydrique mis en œuvre est d'autant plus rapide que le volume du liquide est plus petit et le débit gazeux plus grand.

TABLEAU I

Quantité d'acide cyanhydrique — 0,25 µg

Volume (ml)	Durée d'entraînement en minutes	
	Débit d'azote (litres/heure)	
	30	60
25.....	45	30
100.....	120	75

D'après BOXER et RICKARDS, le taux du transfert de l'acide cyanhydrique serait inversement proportionnel au volume du liquide pour un débit de gaz donné. D'autre part, la mise en circuit des trois absorbeurs destinés à capter les substances interférentes (aldéhydes, alcools, acides volatils) augmente, dans les conditions du mode opératoire utilisé, le temps d'entraînement, de l'ordre de dix minutes. Le débit de gaz maximal est de 60 litres/heure. L'acide cyanhydrique, une fois capté dans l'absorbeur, n'est pas entraîné par le courant gazeux même au bout de 18 heures. Ce n'est le cas pour le débit de 90 litres/heure qui détermine des fuites d'acide à travers les bouchons de caoutchouc et son élimination du liquide absorbant.

Nous avons constaté que dans le cas particulier de notre appareil, le débit de 60 litres par heure est préjudiciable à la rétention de l'acide cyanhydrique dans l'absorbeur contenant un liquide alcalin, le débit maximal étant de l'ordre de 40-45 l/heure.

Il est intéressant de comparer ces chiffres aux résultats obtenus par RAKITINE (1937) concernant l'entraînement de l'acétaldéhyde dans l'appareil d'AGABALIANZ SAVENKOVA (1934), amélioré et qui fait suite à l'appareil de FRIEDEMANN et de ses collaborateurs (1927). Dans ce cas le débit de l'air est de 30 l/heure et la durée de la séparation de l'acétaldéhyde est de 15-20 minutes pour un volume réactionnel de 25 ml. L'auteur précise que ces conditions sont valables pour le ballon de 250 ml de capacité.

Quant au pH du liquide à décyanurer, il est compris, d'après BOXER et RICKARDS entre les pH 3 et 8. Toutefois, la décyanuration optimale et rapide s'effectue à pH 5, au-delà elle devient lente. Le tableau 2 résume des résultats obtenus par BOXER et RICKARDS.

TABLEAU 2

*Volume — 25 ml, contenant 0,33 µg
Débit d'azote : 30 litres/heure
Durée d'entraînement : 45 minutes*

pH	Recouvrement en p. 100
3.....	100
4.....	100
5.....	100
6.....	77
7.....	70
8.....	38

Pour nos essais nous avons utilisé un débit d'air de 36-40 litres/heure et une durée d'entraînement de 1 h 30 mn et ensuite de 2 heures pour un volume de 100 ml.

En se basant sur les enseignements de BOXER et RICKARDS, ALBONICO (1958) préconise un débit d'azote de 45 litres/heure pendant une heure pour un volume de 10-20 ml de vin. Sans doute, il tient compte de la présence d'un réfrigérant à boules ascendant.

BOXER et RICKARDS (1951) ont exprimé quelques réserves en ce qui concerne la transposition de leurs constatations, valables pour les quantités d'acide cyanhydrique ne dépassant pas 0,5 microgrammes.

Remarquons en passant que BOXER et RICKARDS (1951), LUDZACK et ses collaborateurs (1954), et également SERFASS et ses collaborateurs (1952) ont utilisé le procédé d'EPSTEIN (1947) pour le dosage de l'acide cyanhydrique.

A la suite des travaux de M^{lle} SIDELNIK sur la vitesse d'entraînement de l'acide cyanhydrique par un courant d'air à froid sans l'emploi d'un réfrigérant, JAULMES et MESTRES (1960, 1962) ont pu formuler les conclusions suivantes :

- le rendement du barbotage est indépendant de la vitesse de passage de l'air et de la quantité d'acide cyanhydrique ;
- le volume d'air nécessaire pour entraîner quantitativement l'acide cyanhydrique dépend, pour un barboteur donné, du volume du liquide ;
- l'acidité du vin suffit pour l'élimination de l'acide cyanhydrique libre ;
- pour extraire la totalité de l'acide cyanhydrique introduit sous forme de

cyanure de potassium dans le vin, il est nécessaire de faire barboter 30 litres d'air pour 25 ml de vin et un peu plus de 60 litres pour 50 ml de vin.

Nous avons effectué de nombreux essais pour déterminer les meilleures conditions d'entraînement de l'acide cyanhydrique par un courant d'air, en tenant compte de l'existence du réfrigérant et de deux absorbeurs munis de plaques poreuses en verre.

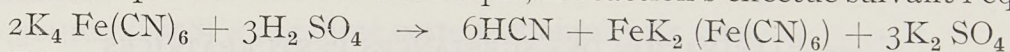
En raison du caractère qualitatif de nos essais, il nous importait d'extraire la plus grande quantité d'acide cyanhydrique nécessaire pour effectuer par la suite la réaction qualitative ou mieux semi-quantitative.

Finalement nous avons choisi un débit de 36 litres/heure et une durée d'entraînement de deux heures pour un volume de 100 ml de liquide acidulé de manière à obtenir le pH 1 et porté à l'ébullition. Or, à cette température et à ce pH le ferrocyanure subit une décomposition avec une production d'acide cyanhydrique.

B. — DÉCOMPOSITION DES SOLUTIONS DE FERROCYANURE DE POTASSIUM, SES FACTEURS

Le ferrocyanure de potassium en solution aqueuse subit une décomposition sous l'influence des acides minéraux (WITTSTEIN 1855), (ASCHOFF 1861) ou organiques (VAN DER BURG 1881) (AUTENRIETH, 1893) en fonction du pH du milieu (KOLTHOFF, PEARSON, 1931 ; NOJI 1947 ; JOSLYN, LUKTON, 1953). Signalons qu'on trouvera la bibliographie complète concernant l'action des acides dans l'ouvrage de GMELIN (1932). Les solutions aqueuses à pH 7 sont stables à la température ordinaire à l'abri de la lumière. Au cours de l'altération du ferrocyanure de potassium, il se forme, comme intermédiaire, l'ion ferroaquapentacyanide $(\text{Fe}(\text{CN})_5 \text{H}_2 \text{O})^{3-}$ (IMORI, 1927). D'après EMSCHWILLER et M^{lle} LEGROS (1955), l'ion responsable de la dissociation en ferroaquapentacyanure et en cyanure n'est pas l'ion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, mais $\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{H}^{3-}$ qui en milieu très acide est uniquement présent. Cette réaction de décomposition est limitée par la réaction inverse de recombinaison des produits formés. D'autre part, sa vitesse augmente avec l'élévation de la température du milieu.

A chaud, en présence d'acide sulfurique, la réaction s'effectue suivant l'équation :



avec la libération de 50 p. 100 d'acide cyanhydrique total, le rendement en poids étant de l'ordre de 20 p. 100. Le ferrocyanure complexe ferropotassique insoluble se décompose lentement en milieu acide (WILLIAMS 1912). L'acide sulfurique à 30 p. 100 le décompose avec la destruction de l'acide cyanhydrique libéré. Comme l'a remarqué également CHELLE et ses collaborateurs (1935), il se dégage plus d'acide cyanhydrique que n'en prévoit l'équation chimique indiquée plus haut.

MACH et FISCHLER (1924) ont constaté que les acides tartrique, acétique ou le vin décomposent le ferrocyanure à la température ordinaire. La décomposition de ce sel par les acides organiques du vin à l'ébullition est beaucoup plus prononcée (REICHARD 1924, 1925). SALVAREZZA (1932) a confirmé que cette décomposition s'effectue à froid en fonction du temps et du pH du milieu.

LUDZACK et ses collaborateurs (1954) ont montré qu'à l'ébullition la décomposition du ferrocyanure s'effectue à 100 p. 100 à pH 2,5, mais au-dessus de cette valeur elle devient moins quantitative, s'annulant pour le pH 10. JAULMES et MESTRES

(1960, 1962) ont montré que le pH 3,05 est déjà défavorable à la décomposition du ferrocyanure tandis qu'à pH 0,65 la libération de l'acide cyanhydrique est complète.

L'emploi de l'acide sulfurique pour la décomposition des ferrocyanures est général. Toutefois, LUDZACK, ALLAN MOORE et RUCHHOFT (1954) préconisent l'acide tartrique à 15 p. 100, tandis que KRUSE et MELLON (1953) préfèrent l'acide phosphorique à 85 p. 100 (35 ml d'acide pour 1000 ml de solution).

Pour faciliter la décomposition du ferrocyanure de potassium WILLIAMS (1912) a proposé l'emploi d'un catalyseur métallique sous forme de chlorure cuivreux, 50-100 mg pour 100 ml de solution à 5 g de ferrocyanure par litre, à pH 0-1, obtenu par l'addition d'acide sulfurique 4 N. HUBACH (1948), ALBONICO (1958) ont employé ce sel dans les vins traités au ferrocyanure, comme d'ailleurs AMERINE et CRUESS (1960). Ces œnologues ne conseillent pas les doses supérieures à 10 mg de chlorure cuivreux pour 20 ml de vin.

Dans les solutions aqueuses de ferrocyanure de potassium la présence de ce sel ne facilite pas la libération de l'acide cyanhydrique (KRUSE, MELLON, 1953).

En 1960 nous avons constaté que dans les solutions aqueuses de ferrocyanure de potassium le chlorure cuivrique freine l'élimination de l'acide cyanhydrique, proportionnellement à la quantité de chlorure. Dans toutes nos expériences les colorations du réactif de MOIR étaient plus faibles par rapport aux témoins. C'est pour cette raison que nous n'avons pas retenu ce catalyseur. JAULMES et MESTRES (1960) ont montré que le comportement du ferrocyanure, en présence des chlorures cuivreux ou cuivrique, n'est pas le même dans l'eau et dans les vins. La présence de ces derniers accélère le départ de l'acide cyanhydrique.

SERFASS et ses collaborateurs (1952) utilisent, pour favoriser la décomposition des ferrocyanures, les chlorures de magnésium et de mercure bivalent.

D'après LUDZACK et ses collaborateurs (1954) il est possible d'arrêter la décomposition du ferrocyanure en ajoutant à la solution 1 gramme de nitrate de plomb, de manière à obtenir le pH 5,6. Comme nous l'avons vu précédemment (BOXER, RICHARD RICHARDS, 1951), l'acide cyanhydrique peut facilement s'éliminer à pH 5. Nous n'avons pas encore essayé ce moyen d'éliminer l'acide cyanhydrique libre existant à côté du ferrocyanure de potassium.

C. — ÉLIMINATION DES SUBSTANCES PERTURBATRICES

1^o) Généralités

La réaction colorée de MOIR obtenue avec l'acétate de cuivre-benzidine est perturbée diversement par les substances volatiles du vin telles que, l'acétaldéhyde, les esters et l'anhydride sulfureux. Ce dernier détruit la coloration du réactif apparaissant en présence de l'acide cyanhydrique. Par contre, les esters et les aldéhydes rendent le milieu trouble ce qui ne facilite pas l'appréciation du changement de la couleur.

Les aldéhydes et les cétones possèdent en plus la propriété de fixer l'acide cyanhydrique, comme d'ailleurs les substances possédant le groupement carbonyle, avec la formation des cyanhydrines.

En 1924 MACH et FISCHLER ont signalé la disparition progressive de l'acide cyanhydrique ajouté aux vins. REICHARD (1924) a attribué ce fait à la formation

des cyanhydrines. Le rôle des aldéhydes dans cette réaction a été démontré par SALVAREZZA (1932).

La décomposition du ferrocyanure de potassium en excès dans le vin et la dissimulation progressive de l'ion cyanhydrique ont été également étudiées par NÉGRE et CORDONNIER (1952).

Il est possible de déterminer l'acide cyanhydrique engagé dans les composés organiques en soumettant le vin à l'action des solutions alcalines (ALBONICO 1958) à la température de 50°.

D'après WINKLER (1939), la fixation de l'acide cyanhydrique par les sucres sous forme des cyanhydrines s'effectue plus rapidement aux pH élevés. Dans ces conditions l'addition des cyanures doit être faite après l'acidification du milieu.

Finalement l'acide cyanhydrique peut exister dans les vins sous forme d'acide libre, de cyanhydrines et de ferrocyanures, ce qui pose le problème de leur séparation, étudié par ALBONICO (1958) et par JAULMES et MESTRES (1960, 1961).

D'après FONTANELLI (1947), une partie de l'acide cyanhydrique, formée dans les vins, peut se combiner avec le soufre pour donner naissance à un sulfocyanure stable.

2°) Procédés d'élimination

Il n'existe pas de procédé unique pour éliminer l'anhydride sulfureux, les aldéhydes et les esters.

MACH et FISCHLER (1924) ont utilisé une solution du bicarbonate de sodium à 4 p. 100, saturée par le gaz carbonique, pour fixer l'anhydride sulfureux. BOSSELMANN (1924) préconise une solution de bicarbonate de sodium à 6 p. 100, portée à 80°C pour capter l'anhydride sulfureux et la solution de chlorure mercurique N/100 dans l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, porté à 60°C pour fixer les aldéhydes.

Nous avons essayé ce procédé compliqué sans obtenir des résultats intéressants. BOXER et RICHARDS (1957) emploient une solution acide de sulfate de cerium destinée à oxyder les aldéhydes et les alcools, une solution acide saturée en sulfate d'argent et une solution décimale d'acide sulfurique pour fixer les acides volatils, l'hydrogène sulfuré.

ALBONICO (1958) a appliqué cette technique aux vins.

L'anhydride sulfureux peut être oxydé par une solution de chlorure ferrique (TARANTOLA, MARCHETTI, 1960). JAULMES et MESTRES (1960, 1962) éliminent les aldéhydes et les esters par évaporation des solutions sur un bain-marie à l'aide d'un jet d'air froid de manière à réduire le volume aux 2/3 environ. Quant aux sulfites, ils sont oxydés en milieu acide par l'iode N/20 en présence d'empois d'amidon, l'excès d'iode étant détruit par la solution de thiosulfate 0,01 N.

Nous avons essayé d'éliminer l'anhydride sulfureux dans les vins en utilisant la technique de désulfitation de BERTIN (1931, 1935) sans résultat valable. L'action de l'eau oxygénée était également inefficace, puisqu'elle provoque dans les vins l'apparition d'autres substances volatiles gênantes.

Le procédé de JAULMES et MESTRE (1960, 1962), nous a paru trop compliqué surtout dans sa partie concernant l'oxydation des sulfites.

Néanmoins nous avons étudié l'influence des esters, de l'aldéhyde acétique et de l'anhydride sulfureux en fonction de leurs concentrations.

L'acétate d'éthyle à la dose de 250 mg par litre ne présente pas d'inconvénient. Cet ester est facilement saponifié par la solution d'hydroxyde de sodium utilisée comme liquide de réception.

Au contraire l'élimination de l'acétaldéhyde ne se fait pas avec la même facilité, comme le montre le tableau 3.

TABLEAU 3

Ferrocyanure de potassium mg/litre	Virage du réactif de MOIR		
	Acétaldéhyde mg/l		
	100	50	25
3	Bleu léger	Bleu	Bleu
2	Bleu très léger	Bleu	Bleu
1	Néant	Bleu très léger	Bleu léger
0,5	id.	Néant	Bleu très léger

D'autre part, en présence de 500 mg d'anhydride sulfureux par litre, la coloration n'apparaît que si la concentration en ferrocyanure de potassium dépasse nettement 1 milligramme par litre. Le virage est également absent pour les solutions aqueuses de ferrocyanures à 0,5, 1 et 2 mg par litre, contenant 10° d'éthanol, 3 g d'acide tartrique, 0,5 g d'anhydride sulfureux et 50 mg d'acétate d'éthyle par litre.

Finalement la technique de JAULMES-MESTRES a été abandonnée surtout en raison des pertes d'acide cyanhydrique pendant l'oxydation de l'anhydride sulfureux en milieu acide. D'après BRUN (1941, p. 797), l'acide cyanhydrique en solution aqueuse est décomposé par l'iode ce qui ne se produit pas en milieu alcoolique.

Dans ces conditions nous étions amenés à étudier l'élimination des substances perturbatrices à l'aide de la solution saturée d'hydroxyde de baryum malgré l'insuccès de la séparation de l'anhydride sulfureux à l'état des sulfites alcalino-terreux constaté par CHELLE, DUBAQUIÉ et TURBET (1935).

Comme on le sait, une solution saturée d'hydroxyde de baryum (38,4 g de Ba(OH)_2 ou de 50 g de $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ par litre d'eau) permet d'éliminer l'anhydride sulfureux sous forme de sulfite peu soluble dans l'eau (197 mg à 20° (PASCAL, 1934) ou 22 mg à 18°C (DUVAL, 1957, p. 624). En présence d'un courant d'air, ce sel s'oxyde en sulfate de baryum encore moins soluble.

Quant au sel de baryum de l'acide acétaldéhyde sulfureux soluble, il se décompose en milieu alcalin au moins partiellement.

Le cyanure de baryum est soluble dans l'eau à raison de 800 g par litre (PASCAL, 1934 p. 1309). Ce sel stable n'est pas décomposé par la chaleur, comme tous les cyanures alcalino-terreux et alcalins (BRUN, 1941, p. 700), ce qui rend possible l'évaporation de ses solutions à chaud. D'ailleurs, cette opération est utile pour éliminer les traces de sulfite de baryum dissous et non oxydé. Par contre, la résinification

et l'oxydation des aldéhydes en milieu alcalin, à la température ordinaire, ne sont pas suffisantes, d'où la nécessité d'utiliser l'évaporation.

En effet, il est possible d'éliminer complètement 50 mg d'anhydride sulfureux au moyen de 40 ml de solution saturée d'hydroxyde de baryum à froid en présence d'un courant d'air tandis qu'on retrouve 4,8 mg de l'acétaldéhyde sur 5 mg ajoutés.

Au début de nos essais nous avons employé l'évaporation ménagée dans des bechers à différentes températures (40°-70°C) en fonction du temps, ensuite l'évaporation à froid sous vide partiel sans, toutefois, obtenir des résultats valables. Également, les essais comprenant l'addition d'oxyde mercurique à la solution d'hydroxyde de baryum dans le but de fixer l'acétaldéhyde sous forme de la combinaison $3\text{HgO}, 2\text{CH}_3\text{COH}$ (GORR, WAGNER, 1925 ; LANGEDYK, 1927), ont été infructueux surtout en raison de la formation de l'oxycyanure de mercure insoluble $\text{Hg}(\text{CN})_2\text{HgO}$.

Finalement nous avons conclu à la nécessité d'une évaporation rapide au bain-marie bouillant ou presque du liquide alcalin étalé sur une surface aussi grande que possible, mais compatible avec l'épaisseur du liquide. A cet effet, le volume de 90 ml de liquide alcalin, les eaux de lavage compris, est versé dans un cristalliseur à bec, de 15 cm de diamètre et de 7 cm de hauteur, la surface du liquide étant de l'ordre de 23,5 cm². L'évaporation de 45 ml au bain-marie électrique, porté à 85°C, c'est-à-dire moitié du volume, demande 20 minutes. Voici les résultats obtenus avec une prise d'essai contenant 22,5 mg d'anhydride sulfureux et 12,5 mg d'acétaldéhyde. Le dosage de l'anhydride sulfureux total suivant la technique de DEIBNER-BENARD (1955), (DEIBNER, 1959), a donné le résultat négatif. Par conséquent, l'élimination de l'anhydride est complète. Par contre, on trouve 0,264 mg d'acétaldéhyde dosé suivant le procédé d'ESPEZEL-JAULMES (ESPEZEL, 1932 ; JAULMES, ESPEZEL, 1932, 1935 ; JAULMES, 1951, p. 418 ; 1953).

En évaporant 3/5 du volume, on trouve dans 36 ml de liquide restant 0,198 mg d'aldéhyde.

Enfin, l'acétaldéhyde est absent si l'on évapore 2/3 du volume c'est-à-dire 60 ml sur le volume initial de 90 ml. La durée de cette opération est de l'ordre de 25-30 minutes.

Dans ces conditions nous avons adopté la technique d'évaporation rapide à 1/3 du volume initial pour éliminer l'acétaldéhyde et d'autres substances aldéhydiques et cétoniques qui peuvent exister dans les vins et les jus de raisin et qui sont entraînées par le courant d'air dans la solution d'hydroxyde de baryum. Sur un bain-marie électrique porté à l'ébullition la durée de l'évaporation est de 15 minutes.

D. — DÉTECTION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE AU MOYEN DU RÉACTIF DE MOIR

1°) Réactif de MOIR

La composition et le mode de préparation du réactif de MOIR jouent un rôle important lors de l'utilisation de la réaction colorée pour la détection de l'acide cyanhydrique.

MOIR (1910) a obtenu son réactif en chauffant à 50°C le mélange aqueux de sulfate de cuivre, de benzidine et d'acide acétique. PERTUSI et GASTALDI (1913)

préfèrent utiliser le mélange d'une solution d'acétate de cuivre à 3 p. 100, d'une solution saturée d'acétate de benzidine et d'eau distillée en proportion 1 : 5 : 15 et même la solution de phosphate bisodique à 10 p. 100 à la place de l'eau. Pour les recherches microchimiques BRUNSWICK (1921) emploie la solution d'acétate de cuivre à 3 p. 100, l'acétate de benzidine à 5 p. 100 et l'eau distillée en proportion 1/10/16. D'après SIEVERTS et HERMSDORF (1921) le mélange de PERTUSI et GASTALDI se conserve pendant deux semaines. Dans ces conditions ils ont proposé l'utilisation de deux solutions distinctes à mélanger au moment de l'emploi en volumes égaux. La première solution contient 2,86 g d'acétate de cuivre par litre d'eau et la deuxième 475 ml de solution aqueuse d'acétate de benzidine diluée à un litre avec de l'eau distillée.

FEIGL (1946, 1953), WENGER, DUCKERT et RUSCONI (1946) font appel à l'acétate de cuivre en solution aqueuse à 3 p. 100 et l'acétate de benzidine à 1 p. 100 dissous dans l'acide acétique à 10 p. 100.

Au cours de nos essais ce dernier mélange ne nous a pas donné satisfaction. Par contre, la formule de BRUNSWICK (1921) semblait être de beaucoup plus sensible par rapport à la première. Finalement nous avons retenu les solutions proposées par SIEVERTS et HERMSDORF (1921) utilisées d'ailleurs par KOTCHERGA (1949).

2°) Appareil

Pour la détection de l'acide cyanhydrique dans les solutions dépourvues de toute substance perturbatrice on fait appel au même appareil de distillation utilisé pour sa séparation. Les absorbeurs à plaque poreuse sont remplacés par les tubes absorbeurs 44 et 46 (voir le dessin 1 - B) qui reçoivent chacun 5 ml de réactif de MOIR. Le débit de gaz d'entraînement (air), passant par les absorbeurs est réglé à l'aide d'un débitmètre. Le tube latéral 43 de l'absorbeur tubulaire 44 est relié à la trompe à eau. Les tubes 44 et 46 sont plongés dans le mélange de glace et d'eau glacée disposé dans un bécher.

3°) Entraînement de l'acide cyanhydrique

Au début de nos essais nous avons utilisé un courant de gaz carbonique appelé à saturer la solution d'hydroxyde de baryum et ensuite entraîner l'acide cyanhydrique libéré.

La saturation de 20 ml de solution d'hydroxyde de baryum demande 20 minutes pour un débit gazeux de l'ordre de 25 litres/heure, le pH du milieu devenant égal à 7,3.

Pour obtenir le pH 6,4 il faut 45 minutes de barbotage. Le dégagement de l'acide cyanhydrique s'effectue sans difficulté à pH 7,3 dans un liquide porté à l'ébullition d'autant plus que le courant du gaz carbonique traverse continuellement l'appareil. Il faut dire que le gaz carbonique protège la coloration du réactif de MOIR mieux que l'air.

Malheureusement le gaz carbonique, comme nous l'avons montré précédemment, contient des substances réagissant avec le réactif de Moir. Il serait évidemment

possible de contrôler la pureté du gaz carbonique en installant avant son entrée dans le ballon distillatoire un absorbeur avec une petite quantité de réactif de MOIR.

Nous préférons utiliser un courant d'air ce qui nous oblige à aciduler préalablement la solution alcaline contenant de l'acide cyanhydrique. En général, pour 40 ml de solution saturée d'hydroxyde de baryum il faut 10 ml d'acide sulfurique normal, ce qui porte le pH du liquide réactionnel à 1. Ce dernier est chauffé à l'ébullition. Il suffit d'un délai de 5 minutes pour constater l'absence ou la présence de l'acide cyanhydrique en observant la couleur du réactif de MOIR qui du jaune devient verdâtre, ou bleuâtre ou bleu net.

4°) *Sensibilité de la réaction colorée*

Nous avons vérifié la sensibilité de la réaction colorée dans les conditions bien déterminées de notre appareil en utilisant comparativement l'air et l'azote très pur (Azote R de la Sté l'Air Liquide). Un volume de 40 ml de solution saturée d'hydroxyde de baryum étant additionné de quantités d'acide cyanhydrique comprises entre 0,055 et 50 microgrammes et ensuite acidulé, dans le ballon distillatoire, par 10 ml d'acide sulfurique à 10 p. 100 en volume. Le débit de gaz était de 16 litres par heure sous une légère dépression provoquée par trompe à eau. Le changement de la coloration du réactif de MOIR s'effectuait dans l'intervalle de 5 minutes à partir du début de l'ébullition régulière du liquide réactionnel. Dans le cas de l'absence du virage la prolongation de l'ébullition même pendant deux heures n'apporte en général aucune amélioration.

TAB^{LE}AU 4

Sensibilité de la réaction colorée de MOIR

HCN microgrammes prise d'essai	Coloration du réactif de MOIR			
	Azote R		Air	
	Essais		Essais	
	1	2	1	2
0,055	—	—	Néant	—
0,11	—	—	id.	—
0,22	—	—	id.	—
1.....	Néant	Virage	id.	Virage
2.....	—	Légère coloration	—	Légère coloration
3.....	—	Plus prononcée	—	—
4.....	—	Bleue	—	—
5.....	Néant	Bleue nette	Décoloration	Verte, bleue nette
5.....	Léger virage	—	Léger virage	—
10.....	—	Bleue belle	Bleu-verte	Bleue belle
20.....	Bleue	—	—	Bleue très belle
50.....	—	—	—	Bleu intense

Les résultats des essais comparatifs consignés dans le tableau 4 montrent que la limite de la sensibilité de la réaction colorée dans les conditions de notre appareillage est de l'ordre d'un microgramme dans la prise d'essai en absence des substances perturbatrices de toute espèce. En admettant que la prise d'essai est de 100 ml, nous voyons que la technique proposée peut déceler 10 microgrammes par litre.

Évidemment en présence des corps gênants tels que l'anhydride sulfureux, l'acétaldéhyde, il devient plus difficile, comme nous le verrons tout à l'heure, d'atteindre la limite indiquée d'autant plus que les pertes en acide cyanhydrique sont normales pendant sa séparation effectuée avant sa détection.

E. — ÉTUDE DE LA SÉPARATION ET DE LA DÉTECTION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE FORMÉ A PARTIR DU CYANURE ET DU FERROCYANURE DE POTASSIUM DANS LES LIQUIDES SYNTHÉTIQUES, DANS LES VINS ET DANS LES JUS DE RAISIN

La vérification de la technique de la séparation et de la détection de l'acide cyanhydrique à partir du cyanure et du ferrocyanure de potassium, tous les deux, séparément ou ensemble, dissous dans les liquides synthétiques ou dans les vins et les jus de raisin, a demandé un grand nombre d'essais. Une partie de ces derniers utilisant du gaz carbonique surtout au cours du premier stade de l'expérimentation a été éliminée en raison du doute concernant la constance de la pureté de ce gaz. D'une façon générale, il est indispensable, au début de la mise en service des bouteilles d'y vérifier l'absence de l'oxygène à l'aide d'une solution de carmin d'indigo contenant 0,2 M de carbonate de sodium (DEIBNER 1955, 1956) et également celle des substances réagissant avec le réactif de MOIR au moyen de ce dernier.

TABLEAU 5

Solution hydroalcoolique d'acide tartrique
Prise d'essai : 100 ml

HCN ou K ₄ FeCy ₆ en microgrammes/litre	Addition en mg/l		Coloration observée
	Acétaldéhyde	SO ₂	
a) HCN			
200.....	Néant	Néant	Belle coloration bleue
100.....	id.	id.	Nette coloration verte bleue
100.....	250	450	id.
50.....	id.	id.	Légère coloration verte bleue
25.....	id.	id.	Décoloration
b) K ₄ FeCy ₆			
250.....	250	450	Coloration bleue nette
125.....	id.	id.	Nette verte bleue
62,5.....	id.	id.	Faible verte bleue

Tout d'abord nous avons utilisé la solution hydroalcoolique (10° G. L.) d'acide tartrique à 4 grammes par litre à laquelle ont été ajoutées des quantités variables de cyanure de potassium ou de ferrocyanure de potassium. Pour ce sel on utilisait une solution aqueuse contenant 100 mg par litre préparée tous les jours, par dilution d'une solution mère à 50 g par litre. Quant à la solution de cyanure de potassium elle contenait 1 mg par litre et était préparée tous les jours par dilution d'une solution à 1 g par litre. L'étalonnage de cette dernière s'effectuait à l'aide de la méthode de DENIGES (1936) suivant les prescriptions de différents traités (DUVAL, 1957, p. 165 ; KOLTHOFF, STENGER, 1947).

Les résultats des essais effectués sont consignés dans le tableau 5.

Il est facile de constater que la concentration limite décelable est de l'ordre de 25 microgrammes d'acide cyanhydrique par litre. En ce qui concerne le ferrocyanure de potassium la technique utilisée permet de trouver 62,5 microgrammes par litre, ce qui correspond en admettant le rendement de la réaction en acide cyanhydrique égal à 20 p. 100, à 12,5 microgrammes d'acide cyanhydrique. Soulignons que ces résultats ont été obtenus en présence de 250 mg d'acétaldéhyde et de 450 mg d'anhydride sulfureux par litre. Comme le montre le tableau 6, ils sont les mêmes dans le cas d'un vin rouge.

TABLEAU 6

Vin rouge
Prise d'essai : 100 ml

HCN ou K ₄ FeCy ₆ microgrammes/litre	Addition en mg/l		Coloration observée
	Acétaldéhyde	SO ₂	
a) HCN			
0.....	0	0	Néant
100.....	0	0	Nette verte bleue
50.....	0	0	Légère verte bleue
100.....	250	450	Nette verte bleue
50.....	250	450	Légère verte bleue
25.....	250	450	Décoloration
b) K ₄ FeCy ₆			
500.....	0	0	Bleue très prononcée
125.....	0	0	Nette verte bleue
62,5.....	0	0	Légère verte bleue
250.....	250	450	Bleue
125.....	id.	id.	Verte bleue
62,5.....	id.	id.	Faible verte bleue

D'autres essais concernent un vin blanc, un vin doux naturel et un jus de raisin additionnés de ferrocyanure de potassium. Les résultats correspondants sont donnés dans le tableau 7.

On remarquera que la détection du ferrocyanure de potassium dans le vin doux naturel n'est pas plus difficile que dans le vin rouge. Par contre, ce n'est pas le cas pour le jus de raisin.

TABLEAU 7

Vin blanc — Vin doux naturel — Jus de raisin

Nature du liquide	K ₄ FeCy ₆ microgrammes par litre	Addition mg/l		Coloration observée
		Acétaldéhyde	SO ₂	
<i>Vin blanc</i>	125,0	0	0	Légère bleutée
	62,5	0	0	Décoloration
	125,0	250	450	Très légère bleutée
<i>Vin doux naturel</i>	125	0	0	Nette verte bleue
	62,5	0	0	Légère bleutée
	125	250	450	Verte bleue
	62,5	250	450	Très légère bleutée
<i>Jus de raisin</i>	500	0	0	Nette bleue
	250	0	0	Nette verte bleue
	125	0	0	Légère verte bleue
	125	250	450	Id.
	HCN			
—	100	0	0	Décoloration

Il est moins aisé de déceler l'acide cyanhydrique formé à partir du cyanure de potassium additionné et même à partir du ferrocyanure de potassium en raison de grandes quantités de sucre.

Tous ces essais ont été effectués avec les prises d'essai de 100 ml de liquide acidulés de manière à avoir le pH 0,95-1,0 maintenue à l'ébullition pendant 2 heures et soumis à l'action d'un courant d'air d'un débit de 36 litres/heure.

Nous avons comparé dans les mêmes conditions l'influence des températures

TABLEAU 8

Influence de la température pendant l'entraînement de l'air

Nature du liquide	HCN ou K ₄ FeCy ₆ microgramme/litre	Coloration observée	
		A température ambiante	A l'ébullition
<i>Solution synthétique</i>	HCN/100	Décoloration	Nette vert-bleu
—	K ₄ FeCy ₆ /500	Néant	Bleue
<i>Vin rouge</i>	HCN/100	Vert-bleu	Nette vert-bleu

sur la séparation de l'acide cyanhydrique formé à partir du cyanure et du ferrocyanure. A la température ambiante nous n'avons pu obtenir de résultat positif pour ce dernier sel. La séparation est moins bonne pour le cyanure par rapport à la température habituellement utilisée (à l'ébullition).

Dans ces conditions nous avons préféré nous contenter, à défaut momentané d'une solution convenable du problème apparu, d'une détection globale de l'acide cyanhydrique issu soit du cyanure, soit du ferrocyanure de potassium, soit de leur mélange.

F) EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE DE LA DÉTECTION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE TOTAL DANS LES VINS ET LES JUS DE RAISIN AU MOYEN DU RÉACTIF DE MOIR

1^o) Principes de la technique

La technique comprend trois opérations distinctes : la séparation de l'acide cyanhydrique par l'entraînement avec de l'air, et sa fixation par la solution d'hydroxyde de baryum, l'élimination des substances gênantes, la détection de l'acide séparé de nouveau par un courant d'air, à l'aide du réactif de MOIR, mélange d'acétates de et de benzidine.

2^o) Séparation de l'acide cyanhydrique au moyen de l'entraînement par un courant d'air et sa fixation par une solution d'hydroxyde de baryum

1) Réactifs

Acide sulfurique pur 20 p. 100 (v/v) $d_{15} = 1,212$

Solution saturée d'hydroxyde de baryum (40 g d'octohydrate $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ par litre) utilisée après sa décantation complète.

Tous ces réactifs doivent être exempts d'acide cyanhydrique et des substances réagissantes avec le réactif de MOIR.

Butanol normal.

2) Protocole opératoire

Appareil distillatoire.

L'ensemble de l'appareil (fig. 1 A) comprend un ballon à fond rond 14, un réfrigérant ascendant 12, à reflux et deux absorbeurs 7 et 3.

Ballon : habituellement son volume est de 250 ml sans tenir compte de celui du col, sa capacité peut varier suivant les besoins. Il est chauffé au moyen d'un chauffe-ballon électrique approprié. (Sté PROLABO).

Réfrigérant : le réfrigérant à reflux (longueurs totale 25 cm, utile 22 cm) est solidaire d'un rodage et d'une ampoule 17 à robinet 16, au-dessus duquel on trouve un tube d'amenée de l'air 15, pénétrant dans le ballon 14, jusqu'à son fond. Le tube latéral 11, muni d'un rodage femelle, permet l'évacuation du courant gazeux vers les absorbeurs 7 et 3.

Absorbeurs : Les absorbeurs peuvent être munis de plaques poreuses, en verre fritté (porosité n° 2) et tout simplement des tubes en verre de 6,5 mm de diamètre intérieur, avec une extrémité étirée, diamètre intérieur de 3 mm. Leurs capacités sont de l'ordre de 154 ml pour le premier et de 95 pour le deuxième ; elles peuvent être réduites si l'on emploie les tubes de dispersion au lieu des plaques poreuses. L'absorbeur 7 est refroidi par un bain d'eau glacée et de nombreux glaçons. Par l'intermédiaire de la tétine 1 les absorbeurs sont reliés à la trompe à eau, qui assure le courant d'air dans l'appareillage. Un manomètre à vide, à cuvette à mercure, type mural (Sté PROLABO) installé dans un support spécial en bois permet de contrôler la constance de la dépression utilisée.

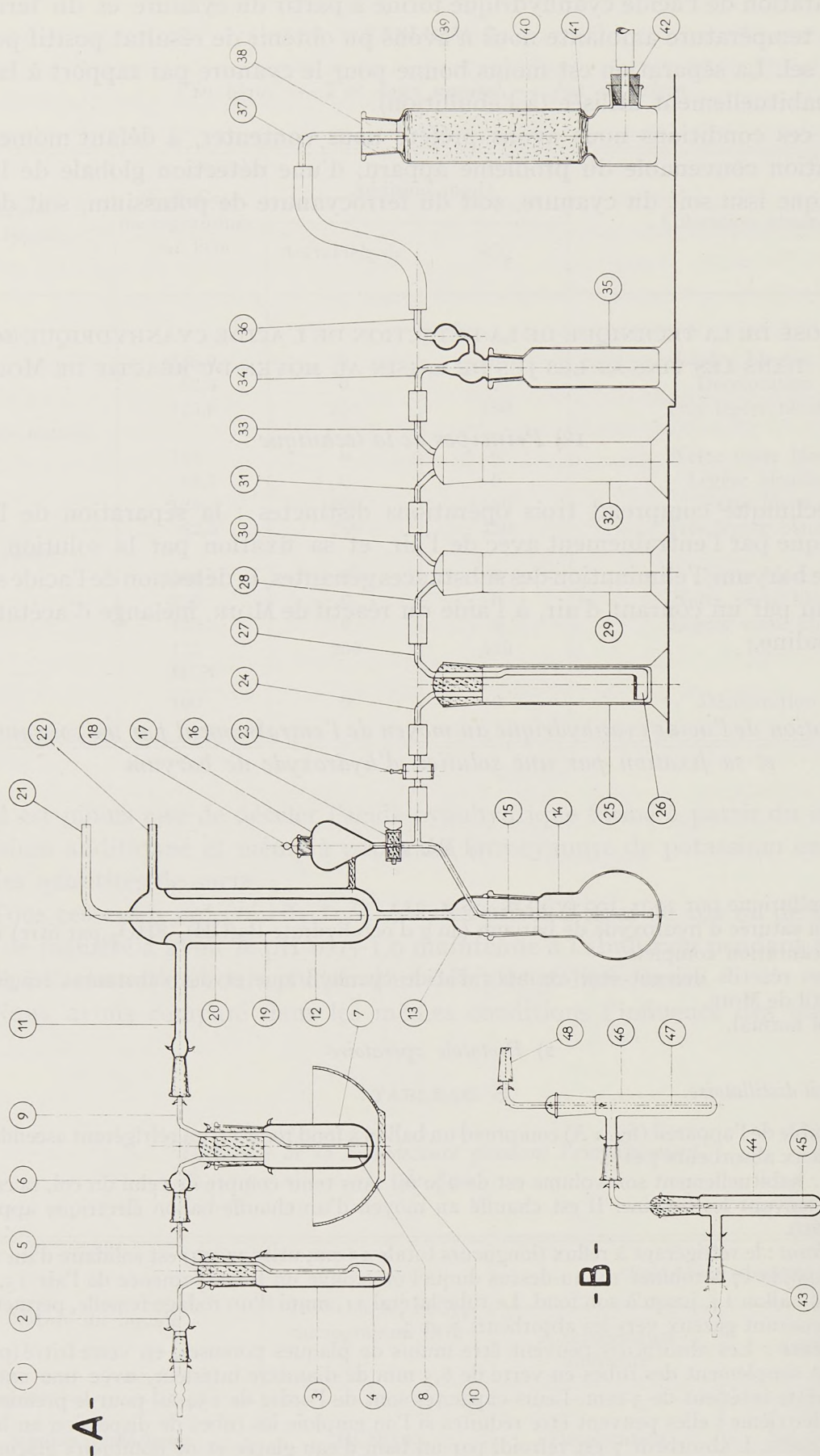


FIG. 1. — Appareil pour la séparation et la détection de l'acide cyanhydrique

Purification de l'air : l'air nécessaire pour effectuer l'entraînement de l'acide cyanhydrique, formé dans le ballon, vers les absorbeurs est prélevé à l'extérieur du laboratoire ; son débit constant, 36 litres/heure, est contrôlé par le débitmètre à capillaires (Sté PROLABO, N° 4596) Il est bien connu, que l'air de laboratoire et même celui de l'extérieur peut contenir différentes impuretés qui doivent être éliminées.

A ce propos signalons que l'atmosphère d'un laboratoire, surtout l'hiver, est contaminée par les émanations de toutes sortes, telles que les gaz brûlés des becs à gaz, vapeurs des produits, etc.

Bien entendu, la fumée des cigarettes constitue un véritable danger.

D'après SCOTT OSBORNE, ADAMEK HOLLS (1956) cette fumée contient de l'acétaldéhyde et de l'acide cyanhydrique dont la présence a été signalée, comme cela ressort de la bibliographie donnée par ces auteurs en 1912 par LEHRMANN. On y trouve au moins six aldéhydes et, entre autres, le 5-hydroxyméthylfurfural et aldéhyde protocatéchique (CHAO-HWA YANG et WANDER). MESTRES (1961) précise qu'une légère bouffée de fumée soufflée dans un tube d'essai donne 0,5 µg d'acide cyanhydrique ce qui démontre la richesse en cet acide de la fumée de cigarettes. Dans ces conditions la purification de l'air doit être énergique. Il est préférable d'employer six absorbeurs-laveurs à plaque, porosité n° 1, dont chaque paire contient une solution aqueuse de chlorure mercurique (HgCl_2) à 5 p. 100, destinée à retenir l'acide cyanhydrique, les aldéhydes puis une solution d'hydroxyde de sodium à 10 p. 100 et enfin de l'eau distillée. L'emploi de six laveurs rend inutile l'emploi de la colonne à chaux sodée 39. Après chaque opération d'entraînement les contenus des laveurs doivent être soigneusement renouvelés. Dans les conditions de notre laboratoire l'air est puisé à l'extérieur et même au niveau de la terrasse dominant les rues, car leur atmosphère paraît être contaminée parfois sensiblement.

Conduite des opérations.

On introduit 20 ml de solution saturée d'hydroxyde de baryum dans chaque absorbeur (à plaque poreuse ou à simple tube d'amenée) ensuite 2 gouttes de butanol normal afin de faciliter une meilleure absorption de l'acide cyanhydrique en raison de la diminution de la tension superficielle (RAKITINE 1937) ; (RICHTER, 1936). Le ballon distillatoire reçoit 100 ml (ou moins suivant le besoin) de vin ou de jus de raisin et 10 ml (ou moins en fonction de la prise d'essai) d'acide sulfurique à 20 p. 100 ($D_{15} = 1,212$) au moyen de l'ampoule 17. Le pH du liquide se situe aux environs de 1. On établit un courant d'air, à l'aide d'une trompe à eau, d'un débit de 36 litres/heure contrôlé par un débitmètre, la dépression étant de l'ordre de 15 cm dans le cas des absorbeurs à plaque et de 10 cm pour les absorbeurs à tube effilé. Il faut deux heures d'entraînement à partir du moment où le liquide du ballon chauffé électriquement entre en ébullition.

Le premier absorbeur 7 est plongé dans un mélange d'eau glacée et de glaçons, souvent, complétés au cours de l'opération de l'entraînement. Une fois cette opération terminée les liquides alcalins de deux absorbeurs sont réunis ainsi que les eaux de lavages utilisées pour le rinçage de leur intérieur et de leurs plaques ou des tubes. Tout de suite après la fin de l'opération on fait passer pendant 5 minutes un violent courant d'air fourni par une soufflerie électrique à travers l'appareil de distillation et les absorbeurs vides. Ensuite, les absorbeurs et le ballon sont abondamment lavés à l'eau courante et rincés avec de l'eau distillée. Quant au réfrigérant, son lavage demande au moins 3 litres d'eau. Ces précautions sont nécessaires pour éliminer toute trace d'acide cyanhydrique résiduaire.

3°) Évaporation

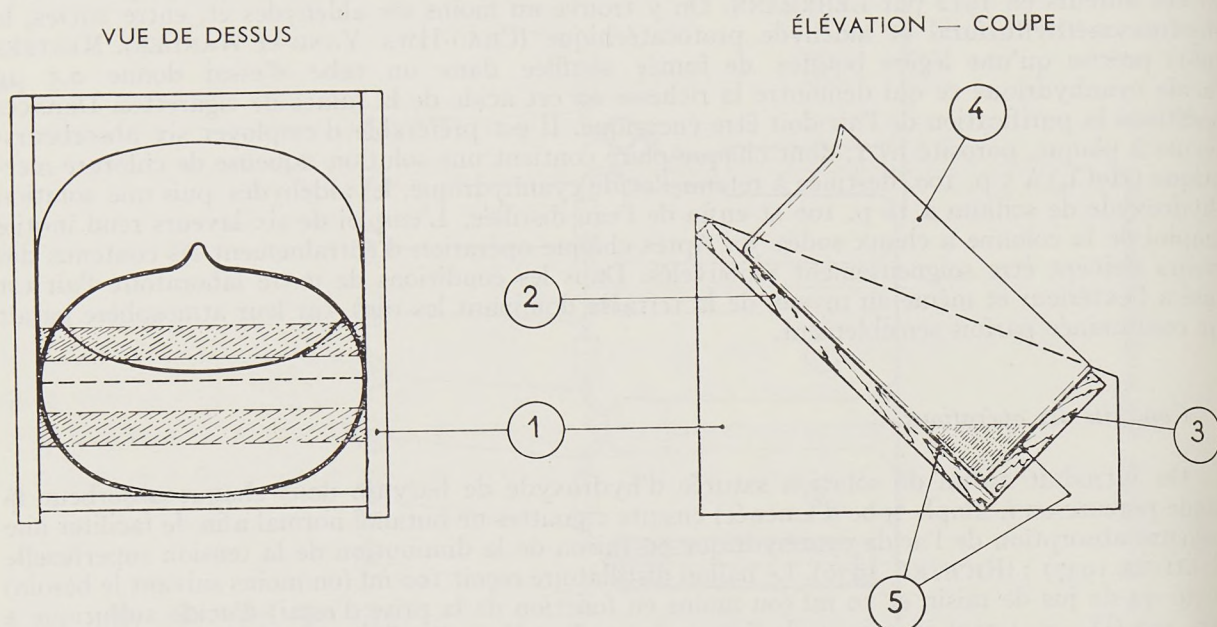
Protocole opératoire

Les solutions d'hydroxyde de baryum des deux absorbeurs et les eaux de lavage réunies représentent un volume de 90 ml environ. Ce dernier est versé dans un cristalliseur d'une capacité d'un litre à bec (dimensions : diamètre 15 cm, hauteur 7 cm), ce qui permet d'étaler le liquide sur la surface de 23-24 cm². Ce cristalliseur est disposé dans un bain électrique carré (Éts COUPRIE) couvert d'une plaque en aluminium. Cette dernière possède une ouverture circulaire correspondant au diamètre du cristalliseur posé sur un support métallique pour les tubes à essai (sa bande perforée de caoutchouc doit être enlevée), faisant d'ailleurs partie du bain-marie. La distance entre le fond du cristalliseur et le niveau de l'eau dans le bain est de 2 cm, de sorte que le cristalliseur est chauffé par la vapeur d'eau portée à l'ébullition. Dans ces conditions la réduction du volume de 90 ml à 30 ml, c'est-à-dire à un tiers du volume initial dure 15 minutes au minimum à condition que l'eau du bain-marie soit déjà en ébullition.

Bien entendu, l'opération d'évaporation doit se faire dans une sorbonne ventilée afin d'éliminer les risques d'absorption par le liquide alcalin étalé en couche mince des vapeurs des substances perturbatrices. L'évaporateur laisse une légère croûte humide tout le long de la circonférence inté-

rieure du cristalliseur tout juste au-dessus du niveau du liquide alcalin en raison du grimpage. Heureusement ce sel stable n'est pas décomposé par la chaleur (BRUN, 1941 p. 799), comme nous l'avons précisé précédemment.

Le contrôle de l'opération d'évaporation s'effectue au moyen d'un petit caisson en bois à plan incliné (voir la figure 2) muni de deux bandes, dont les bords externes correspondent au volume de 30 ml. Le liquide alcalin est filtré à travers un filtre sans cendres (DURIEUX, bande bleue), de diamètre 12 cm disposé sur l'entonnoir cannelé à filtration rapide à tige longue (Pyrex n° 518 diamètre extérieur 9 cm). Le dépôt salin dans le cristalliseur est lavé deux fois avec de l'eau distillée et versé sur le filtre qui est lavé à son tour. Finalement le volume du filtrat est porté à 80 ml environ.



Échelle 1/2

FIG. 2. — Dispositif facilitant le contrôle de l'évaporation des solutions

4^o) Détection de l'acide cyanhydrique

1) Réactifs

Acide sulfurique à 10 p. 100 (v/v) $D_{15} = 1,013$

Réactif de MOIR

Solution A : dissoudre 2,86 g d'acétate de cuivre dans un litre d'eau distillée.

Solution B : Solution aqueuse d'acétate de benzidine saturée. Diluer 475 ml à un litre avec de l'eau distillée. Au moment d'emploi on mélange les volumes égaux de chaque solution. Le réactif de MOIR, ainsi que les solutions A et B doivent être conservés dans les flacons en verre jaune. Soulignons que le réactif de MOIR doit être renouvelé journellement.

2) Protocole opératoire

— Appareil distillatoire :

On utilise le même appareil distillatoire décrit pour la séparation de l'acide cyanhydrique, sauf les absorbeurs qui sont remplacés par les tubes-absorbeurs 44, 46 (voir figure 1 - B). Le dessin ne montre pas le détail des tubes d'amenée du courant gazeux 45, 47. En effet, les extrémités des tubes sont étirées sur une longueur de 2 cm de manière à former une ouverture terminale de 3 mm de diamètre. Les tubes absorbeurs sont plongés dans un bain d'eau glacée et de glaçons. L'épuration de l'air s'effectue dans les mêmes conditions que pour la séparation de l'acide cyanhydrique. Le chauffage du ballon distillatoire est assuré par un chauffe-ballon électrique réglable.

— Conduite des opérations :

On garnit chaque tube absorbeur avec 5 ml de réactif de MOIR. Le liquide alcalin, contenant du cyanure de baryum, est transvasé dans le ballon distillatoire. A l'aide de l'ampoule on y introduit 10 ml d'acide sulfurique à 10 p. 100. Ensuite on établit un courant d'air purifié d'un débit de 18 litres/heure, contrôlé au moyen d'un débitmètre à capillaires. La dépression obtenue à l'aide d'une trompe à eau, doit être de l'ordre de 8,5-9 cm. Son contrôle est assuré par un manomètre à mercure. Le liquide du ballon distillatoire est porté à l'ébullition. A partir de ce moment on observe pendant cinq minutes le virage du réactif de MOIR dans les tubes absorbeurs. Si au bout de ce délai on ne constate aucun changement de la couleur, l'essai est considéré comme négatif. La coloration une fois apparue se maintient pendant 15-20 minutes ou plus, suivant les quantités d'acide cyanhydrique mais ensuite elle subit des modifications suivies de son affaiblissement même après l'arrêt du courant d'air.

Bien entendu, il est indispensable d'effectuer au moins deux essais à blanc avec tous les produits utilisés afin d'éprouver leur pureté au point de vue de l'absence de traces d'acide cyanhydrique. Ces essais sont à refaire chaque fois après le renouvellement des réserves des réactifs. En outre, la vérification de la pureté de l'air utilisé est également nécessaire.

5°) *Domaine de l'application du procédé, ses avantages, ses inconvénients*

Le procédé proposé permet de détecter 62,5 microgrammes (0,0625 mg) de ferrocyanure de potassium par litre de vin ou de jus de raisin, ce qui correspond à 12,5 μg d'acide cyanhydrique. Quant à l'acide cyanhydrique libre, on décèle 25 microgrammes par litre. Dans ces deux cas la présence de 250 mg d'acétaldéhyde et de 500 mg d'anhydride sulfureux par litre ne constitue aucune gêne, grâce à l'excellence de la technique de leur élimination. D'ailleurs, l'utilisation de l'hydroxyde de baryum en présence du courant d'air et de l'évaporation ultérieure de la solution de cyanure de baryum constitue l'originalité de notre procédé.

Pour les faibles concentrations d'acide cyanhydrique il est possible de les déterminer semi-quantitativement en se basant sur les colorations progressives du réactif de MOIR. En effet, la décoloration du réactif, c'est-à-dire le premier virage du jaune vers le vert correspond à la concentration de 25 μg d'acide cyanhydrique par litre, tandis que la coloration bleue indique celle de 100 μg .

En principe, comme nous l'avons vu précédemment, le réactif de MOIR peut déceler 10 μg d'acide cyanhydrique par litre pour une prise d'eau de 100 ml, mais en raison de toutes les manipulations cette limite ne peut être atteinte dans les conditions du mode opératoire proposé.

Parmi les inconvénients de notre procédé il faut noter tout d'abord sa durée qui atteint quatre heures, ensuite la nécessité d'employer des prises d'essai élevées de l'ordre de 100 ml ce qui d'ailleurs conditionne la durée de chaque essai.

La détection concerne à la fois l'acide cyanhydrique libre et l'acide cyanhydrique formé à la suite de la décomposition du ferrocyanure de potassium. En plus, la teneur en acide cyanhydrique total n'englobe pas celle en acide cyanhydrique engagé dans les composés organiques. D'ailleurs les différents procédés JAULMES et MESTRES (1960, 1962) négligent cette forme d'acide cyanhydrique. On peut encore reprocher au réactif de MOIR de donner, dans les conditions de notre mode opératoire, les colorations instables en fonction du temps, mais ce défaut ne constitue pas une gêne pour la détection de l'acide cyanhydrique comme nous l'avons constaté.

La nécessité d'effectuer deux opérations d'entraînement par un courant d'air constitue une complication nécessaire au point de vue analytique. En effet, la sépa-

ration de l'acide cyanhydrique par courant d'air et l'élimination des substances perturbatrices, telles que l'anhydride sulfureux, les aldéhydes et les esters, nous permettent d'éviter les opérations fastidieuses et souvent délicates préconisées par d'autres procédés.

Signalons que le rendement de l'opération de séparation de l'acide cyanhydrique par courant d'air est de l'ordre de 90 p. 100 et même plus. Cette vérification a été faite à l'aide du procédé électrophotométrique de dosage de cet acide basé sur l'emploi du réactif pyridinobarbiturique (ASMUS et GARSENAGEN, 1953), MURTY et VISWANATHAN, 1961).

L'exposé de ce procédé, adapté aux jus de raisin et aux vins, sera publié prochainement (DEIBNER).

Reçu pour publication en juillet 1963.

SUMMARY

THE DETECTION OF FERROCYANIDES AND HYDROCYANIC ACID IN GRAPE JUICE AND WINE BY THE MOIR REACTION

Colorimetric detection of hydrocyanic acid in wine and grape juice by means of MOIR's reagent had up to now not received much attention. The only process in actual use did not possess a high enough standard of efficacy. The authors believed that it would be useful to make a contribution to the study of this process because in their opinion its perfection could offer research a rational solution to an important analytical problem of wine chemistry.

Systematic research based upon the use of a saturated solution of barium hydroxide had enabled them to develop a technique for the separation of troublesome substances (sulphur dioxide, aldehydes, esters). In fact, barium hydroxide in the presence of a current of air completely eliminated sulphur dioxide, while a subsequent reduction of its volume by rapid evaporation brought about the removal of the aldehyde and ketone compounds. It was this technique which gave originality to the process, thus restored for the detection of hydrocyanic acid with MOIR's reagent.

The process enabled the detection of 62.5 micrograms of potassium ferrocyanide which corresponded to 12.5 micrograms of hydrocyanic acid, even in the presence of 250 mg of acetaldehyde and 500 mg of sulphur dioxide per litre. The detection concerned the hydrocyanic acid formed during the decomposition of potassium ferrocyanide in a boiling acid medium.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGABALIANZ G., SAVENKOVA O., 1934. Procédé iodométrique de dosage des aldéhydes (trad.). *Troudy Donskoï Opit. Stantsii Vinogr. Vinodeliya.* (Trav. Station Exper. Œnol. Vit. du Don), **2**, 59.
- ALBONICO F., 1958. Ricerche sul trattamento dei vini con ferrocianuro di potassio. *Riv. Vit. Enol.*, n° **11**, 352, n° **12**, 387.
- AMERINE M., CRUESS W., 1960. *The technology of wine making*, 648. The Avi Publishing Co, Wesport.
- ANONYME, 1953. *The Chemistry of the ferrocyanides*, **7**. Amer. Cyanamid Co, New York.
- ASCHOFF H., 1961. Über die Einwirkung der Schwefelsäure auf Kaliumeisencyanür. *Arch. Pharm.*, **156**, 259, 265.
- ASMUS E., GARSENAGEN H., 1953. Über die Verwendung der Barbitursäure für die photometrische Bestimmung von Cyanid und Rhodonid. *Z. Anal. Chem.*, **138**, 414.
- AUTENRIECH W., 1893. Zur Kenntnis des gelben Blutlaugensalzes und über den Nachweis von Blausäure neben Ferrocyaniden. *Arch. Pharm.*, **231**, 99.
- BASSELMANN H., 1924. Über die Schönung des Weines mit Ferrocyankalium. *Z. Unters. Nahr. Gemusmitt.*, **47**, 209.
- BERTIN Ch., 1931. Dosage de l'acidité volatile des vins sulfités. *Bull. Inst. Œnol. Alger.*, **25**.
- BERTIN Ch., 1935. *Id.*, *Ann. Fals. Fraudes*, **27**, 170.

- BISHOP L., 1927. C. L. V. The estimation of cyanogenetic glucosides. *Biochem. J.*, **21**, 1162.
- BOXER G., RICKARDS J., 1957. Chemical determination of Vitamine B₁₂. II. The quantitative isolation et colorimetric determination of milligram quantities of cyanide. *Arch. Biochem.*, **30-31**, 372.
- BROCKELT G., POHLOUDEK FABINI R., 1957. Über die Mikrobestimmung von Blausäure. *Die Pharm.*, **13**, n° 12, 737.
- BRUN P., 1932. Composés cyanés, dans PASCAL P. *Traité de Chimie minérale*, **5**, 261, 263.
- BURNSWIK H., 1921. Der mikrochemische Nachweis pflanzlicher Blausäureverbindungen. Eine neue mikrochemische Methode zum Nachweis von Cyanwasserstoff und Emulsin. *Sitzungsber. Akad. Wien.*, **130**, 383.
- BRUNSWIK H., 1923. Die Mikroquantitative Bestimmung von Blausäure pflanzlichen Blausäureverbindungen und Emulsin. *Oster. Bot. Ztschr.*, **72**, 58.
- Chao-Hwa YANG, WENDER S., Identification of 5-hydroxymethylfurfural aldehyde and protocatechnic aldehyde in cigaret smoke. *Tobacco Sci.*, **6**, 156 (d'après Chem. Abstr., 1963, **58**, n° 2, 1729 f.).
- CHELLE L., DUBAQUIÉ J., TURBET H., 1935. Étude toxicologique sur le collage bleu. *Bull. Trav. Sté Pharm. Bordeaux*, n° 1, 9; *Bull. Sté. Chim. Fr.*, **2**, 845.
- CORDIER P., 1950. Aldéhydes, dans GRIGNARD V. *Traité de Chimie Organique*, **7**, 89, Masson éd., Paris.
- CORDONNIER R., 1952. L'étude de l'élimination du fer dans les vins blancs par le phytate de calcium. *Ann. Fals. Fraudes*, **45**, 415.
- CRAMER M., 1941. Amines, dans GRIGNARD V. *Traité de Chimie Organique*, **12**, 357, Masson éd., Paris.
- DECKERT W., 1930. Ein Gerät für die quantitative Bestimmung geringsster Blausäuremengen in Luft mit Hilfe der Benzidin-Kupferazetat-Reaction. *Z. f. Desinfektions und Gesundheitswesen*, **22**, 81.
- DEIBNER L., BENARD P., 1955. Dosage de l'anhydride sulfureux total et de l'ion sulfurique dans les liquides organiques. Application aux vins, aux jus de raisin et aux solutions de sucre cristallisé. *Ind. Alim. Agr.*, **72**, n° 9-10, 565; n° 11, 573.
- DEIBNER L., 1955. Pressoir à filtre de laboratoire pour l'extraction du jus de baies de raisin à l'abri de l'air et à des pressions connues variables. *Ind. alim. Agr.*, **72**, n° 5, 323.
- DEIBNER L., 1956. Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les jus de raisin et les vins. Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins. *Ann. Technol., agric.*, **5**, 31.
- DEIBNER L., 1959. L'anhydride sulfureux et l'ion sulfurique dans les vins et les jus de raisin. Différentes méthodes de leur évaluation quantitative. Exposé d'une technique synchronisant le dosage de ces composés par iodométrie et gravimétrie. *Rev. Ferm., Ind. Alim. Bruxelles*, **14**, n° 5, 180; n° 6, 227.
- DEIBNER L. Dosage électrophotométrique de l'acide cyanhydrique dans les vins et les jus de raisin à l'aide du réactif pyridinobarbiturique (à paraître).
- DENIGÈS G., CHELLE L., LABAT A., 1936. *Précis de chimie analytique* **1**, 818, Maloine éd., Paris.
- DUAL CL., 1957. *Traité de microanalyse minérale quantitative et qualitative*, **5**, 624, Presses scient. Intern., Paris.
- EDGE R., 1958. The detection of cyanides and ferrocyanides in wines. *South Afr. J. Agric. Sc.*, **1**, n° 3, 337.
- EMSWILLER G., LEGROS L. M^{lle}, 1955. Cinétique et équilibre de dissociation des ferrocyanures en solution aqueuse. *C. R. Ac. Sci.*, **241**, n° 1, 44.
- EPSTEIN J., 1947. The estimation of microquantities of cyanide. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **19**, 272.
- ESPEZEL P., 1932. L'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. *Thèse Pharm. Montpellier*.
- FEIGL F., 1946. *Qualitative analysis by spot test*. Elsevier Publ. C°, New York.
- FEIGL F., 1953. *Spot tests*. Elsevier, Amsterdam.
- FEIGL F., 1958. *Qualitative analysis mit Hilfe von Tüpfelreaktionen*, 179, 298.
- FONTANELLI G., 1947. Il ferrocianuro di potassio come chiarificante dei vini soggetti a casse ferrica. *Agri-coltura Italiana*, **47**, 249.
- FRIEDEMANN T., COTONIO M., SHAFFER P., 1927. The determination of lactic acid. *J. Biol. Chem.*, **73**, 335.
- GMELIN, 1932. *Handbuch der anorganischen Chemie*, 8 Auflage, N° 59, Teil B, Verlage Chemie, Berlin.
- GORR G., WAGNER Y., 1925. Über eine neue Methode zur Trennung des Äthylalkohols von Acetaldehyd und Aceton. *Biochem. Z.*, **161**, 488.
- HUBACH C., 1948. Detection of cyanides and ferrocyanides in wines. *Anal. Chem.*, **20**, 1115.
- IMORI S., 1927. *Z. anorg. Allgem. Chem.*, **167**, 145 (d'après Anonyme 1963, The Chemistry of the Ferrocyanide) **7**, 32, American Cyanamid C°, New York).
- JAULMES P., 1951. *Analyse des vins* 418, Dubois-Poulain éd., Montpellier.
- JAULMES P., 1953. Le dosage de l'acétaldéhyde et ses applications en analyse des vins et spiritueux. *Mises au point de chimie analytique pure et appliquée et d'analyse bromatologique*, 1 Série, 56, Masson éd., Paris.
- JAULMES P., ESPEZEL P., 1932. Le dosage de l'acétaldéhyde dans les vins et spiritueux. *Bull. Pharm. Sud-Est*, 295.
- JAULMES P., ESPEZEL P., 1935. Id *Ann. Fals. Fraudes*, **28**, 325.
- JAULMES P., MESTRES R., 1960. Recherche et dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins traités au ferrocyanure. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **53**, 455.
- JAULMES P., MESTRES R., 1962. Le dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins. *Ann. Technol. Agric.*, **11**, 24.

- JAULMES O., MESTRES H., HENRY Cl., 1958. Volatilité de l'acide cyanhydrique en solution diluée (aqueuse et hydroalcoolique). *Bull. Sté Chim. Fr.*, 147.
- JOSLYN M., LUKTON A., 1953. Prevention of cooper and iron turbidities in wine. *Hilgardia*, **22**, n° 14, 451.
- KOLTHOFF I., 1918. Über den Nachweis und Bestimmung Kleiner Mengen Cyanwasserstoff. *Z. Anal. Chem.*, **57**, 3.
- KOLTHOFF I., PEARSON E., 1931. Stability of potassium ferrocyanide solutions. *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, **3**, 381.
- KOLTHOFF I., STENGER V., 1947. *Volumetric analysis*, **2**, 255. Interscience, Publishers, New York.
- KOTCHERGA P., 1949. Sur la théorie du vieillissement du vin (trad.) *Troudy Krasnod. Instituta Pischevoi Promisch.* (Travaux de l'Institut de l'industrie alimentaire de Krasnodar U. R. S. S.), Fasc. 6, 27.
- KRUSE J., MELLON M., 1953. Colorimetric determination of cyanid and thiocyanate. *Anal. Chem.*, **25**, 446.
- LANGEDYK K., 1927. La détermination quantitative de l'aldéhyde acétique dans les solutions très diluées. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **46**, 218.
- LIEB H., ZACHERL M., 1932. Ein vereinfachter Apparat zur Bestimmung der Milchsäure. *Hoppe Seylers Z.*, **211**, 211.
- LUDZACK F., ALLAN MOORE W., RUCHHOFT C., 1954. Determination of cyanides in water and waste samples. *Anal. Chem.*, **26**, n° 11, 1784.
- LUDTKE M., 1952. Über das Linamarin des Leinsamens und seine Bestimmung. *Biochem.*, **322**, 310.
- MACH F., FISCHLER N., 1924. Nachweis und Bestimmung Kleiner Cyanmengen im Wein und Beitrage zur Prüfung des Möslinger'schen Schönungsverfahrens. *Z. für Unters-Nahr-Gemussmitt.*, **47**, 329.
- MESTRES R., 1961. Note sur la recherche du traitement des vins au ferrocyanure de potassium. Extraction d'acide cyanhydrique à partir de vins normaux. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **54**, 284.
- MICONI C., 1952. Ricerca dell'acido cianidrico nei vini. *Riv. Vit. Enol.*, **5**, 183.
- MOIR J., 1910. Test for hydrocyanic acid. *Chem. News*, **102**, 17.
- MONTAGNE M., 1945. Acides alcools ou acides hydroxylés dans Grignard V. *Traité de chimie org.*, **9**, fasc. 1, 21, Masson, Paris.
- MURTY G., VISWANATHAN, 1961. Determination of traces of cyanide. *Anal. Chim. Acta*, **25**, 293.
- NÈGRE E., CORDONNIER R., 1952. Ferrocyanure de potassium et phytate de calcium. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **38**, 346.
- NOJI K., 1947. Relation between HCN liberation from C_2N_2 compounds and H-ion concentration. *Pharm. Soc. Japan*, **67**, 6.
- PASCAL P., 1933. *Traité de chimie minérale*, **8**, 1051.
- PASCAL P., 1934. *Traité de chimie minérale*, **6**, 1253, Masson Co, Paris.
- PERTUSI C., GASTALDI E., 1913. Neue allgemeine Methode zum Nachweis der Blausäure. *Chem. Zeitung*, **37**, 609.
- RAKITIN J., 1937. Absorber for acetic aldehyde determination (en anglais). *C. R. Ac. Sci. U. R. S. S.*, **14**, n° 7, 445.
- REICHARD O., 1924. Blausäurehaltige Weindistillate. *Z. Unters. Nahr. Gemusmitt.*, **47**, 337.
- REICHARD O., 1925. Ist der Nachweis von Blausäure ein Beweis für die verfälschung von Weindistillaten? *Wein und Rebe*, **6**, n° 11, 415.
- RICHTER, 1936. *C. R. Ac. Sci. U. R. S. S.*, **11**, n° 7 (d'après RAKITIN Y., 1937, Absorber for acetic aldehyde determination. *C. R. Ac. Sci. U. R. S. S.*, **14**, n° 7, 445).
- SALVAREZZA M. Chiarificazione dei vini con ferrocianuro di potassio. 1934. *Ann. Chim. Applic.*, **24**, 9, 1932-1934. *Ann. R. Staz. Enol. Sper. Asti*, **1**, 330.
- SCOTT OSBORNE J., ADAMEK S., MOLLES M., 1956. Some components of gas phase of cigarette smoke. *Anal. Chem.*, **28**, 216.
- SEIFERT P., 1955. Blausäure Verbindungen dans Paech K., Thacey M. *Modern methods of plant analysis*, **4**, 676. Springer Verlag ; Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- SERFASS E., FREEMAN R., DODGE B., ZABBAN W., 1952. Analytical methods for the determination of cyanides in plating wastes and in effluents from traitement processes. *Plating*, **39**, n° 3, 267.
- SIEVERTS A., HERMSDORF A., 1921. Der Nachweis gasförmiger Blausäure in Luft. *Z. f. angew. Chem.*, **34**, 3.
- TARANTOLA C., MARCHETTI G., 1960. La demetallizzazione dei vini con ferrocianuro potassico e l'eventuale formazione di acido cianidrico. *Atti. Accad. Vite, Vino*, **12**, 127.
- VAN DER BURG E., 1881. *Ber.* **14**, 1012 (d'après Anonyme 1953, *The chemistry of the ferrocyanides* **7**, American Cyanamid Co, New York).
- WENGER P., DUCKERT R., RUSCONI Y., 1946. *Traité de chimie analytique minérale*, 316. Librairie de l'Université, Genève.
- WILLIAMS H., 1912. A new method for the estimation of ferrocyanides. *J. Soc. Chem. Ind.*, **31**, 668.
- WINKLER W., 1939. Report on fumigation residues in foods. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, **22**, 349.
- WINTON A., WINTON K., 1947. *The analysis of foods*, 223. Wiley Y., New York, Chapman and Hall, London.
- WITTSTEIN, 1855. *Jahresber.*, **8**, 437 (d'après MOISSAN H., 1905, *Traité de chimie minérale*, **4**, 414, Masson, Paris).

MISE AU POINT

RÔLE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

R. ROSSET

Station de Technologie végétale, route de Saint-Cyr, Versailles (Seine-et-Oise)

PLAN

I. ACIDES NUCLÉIQUES

- A. ARN soluble : localisation — extraction et purification — composition — structure — spécificité — synthèse.
- B. ARN des ribosomes : localisation — extraction et purification — propriétés.
- C. ADN : propriétés — structure — synthèse.
- D. ARN à marquage rapide : mise en évidence — propriétés — synthèse.

II. MÉCANISMES DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

A. Mécanismes enzymatiques.

- 1^o) Activation des acides aminés : réaction d'activation — enzymes activateurs.
- 2^o) Transfert de l'acide aminé activé sur une chaîne polynucléotidique : rôle d'un ARN cytoplasmique — enzymes responsables — intermédiaire obligatoire dans la synthèse des protéines.
- 3^o) Formation des chaînes polypeptidiques sur les ribosomes : rôle des ribosomes — transfert des acides aminés sur les ribosomes — synthèse des chaînes peptidiques.
- 4^o) Autres systèmes d'incorporation des acides aminés : peptides de membranes — systèmes divers — énergie et transpeptidation.

Abbreviations :

ARN : acide ribonucléique ; s ARN : acide ribonucléique soluble.

ADN : acide désoxyribonucléique ; AMP, GMP, CMP, UMP : respectivement adénosine, guanosine, cytidine, uridine monophosphate (ou encore acides adénylique, guanylique, cytidylique, uridylique) ; d AMP : désoxyadénosine monophosphate ou acide désoxyadénylique ; ATP, GTP, CTP, UTP : respectivement adénosine, guanosine, cytidine, uridine triphosphate ; poly U : acide polyuridylique ; poly UG, poly UC : respectivement copolymère de l'acide uridylique et de l'acide guanylique, de l'acide uridylique et de l'acide cytidylique.

B. Spécificité des protéines.

- 1^o) Structure des protéines : structure et activité — matrice et matériel génétique.
- 2^o) ARN-messenger.
- 3^o) Déchiffrage du code : nature du code et colinéarité du matériel génétique — systèmes *in vitro* et ARN messenger — éléments du code — adaptateur nucléotidique des acides aminés — dégénérescence du code — universalité du code.

C. Contrôle de la synthèse des protéines.

- 1^o) Systèmes induits et réprimés : adaption — inhibition.
- 2^o) Constitution génétique et gène régulateur.
- 3^o) Gène opérateur et opéron.

III. CONCLUSION

Les mécanismes biochimiques nécessaires à la vie et à la naissance des cellules font intervenir des chaînes de réactions catalysées par des enzymes. D'une espèce à l'autre, les différences qu'on observe sont liées à des variations de nature, de teneur et d'activité de ces enzymes.

A côté des polypeptides associés aux acides nucléiques que nous trouvons dans les membranes et parois cellulaires, les enzymes constituent la plus grande partie des protéines solubles des cellules.

Nous allons nous efforcer de préciser les mécanismes qui interviennent dans la synthèse des enzymes, et également ceux qui sont responsables de la spécificité de l'équipement enzymatique des cellules.

Comme les acides nucléiques interviennent à plusieurs stades de la synthèse des protéines, nous allons dans une première partie étudier leurs propriétés.

I. — LES ACIDES NUCLÉIQUES

Les acides nucléiques sont des chaînes polynucléotidiques formées de résidus de pentose reliés entre eux par des résidus phosphate établissant un pont entre les positions 5' et 3' de deux pentoses consécutifs, tandis que sur la position 1' on trouve une base azotée (tabl. 1).

On peut trouver comme pentose, le ribose dans l'acide ribonucléique (ARN) ou le désoxyribose dans l'acide désoxyribonucléique (ADN). Au nombre des bases puriques on trouve essentiellement l'adénine et la guanine, et au nombre des bases pyrimidiques l'uracile et la cytosine dans l'ARN, la thymine et la cytosine dans l'ADN.

On distingue dans la cellule plusieurs types d'acides nucléiques dont les rôles sont différents ; nous les examinerons successivement.

TABLEAU I
Structure des acides ribonucléiques

Bases	Nucléosides (base + ribose)	Nucléotides (base + ribose + phosphate)
<i>Puriques</i>		
Adénine	Adénosine	AMP
(6 aminopurine)	9-β-D ribofuranosido-adénine	Adénosine 5' phosphate
Guanine	Guanosine	GMP
(2 amino-6 hydroxypurine)	9 β-D ribofuranosido-guanine	Guanosine 5' phosphate
<i>Pyrimidiques</i>		
Cytosine	Cytidine	CMP
(2 hydroxy-6 aminopyrimidine)	3 β-D ribofuranosido-cytosine	Cytidine 5' phosphate
Uracile	Uridine	UMP
(2-6 dihydroxypyrimidine)	3 β-D ribofuranosido-uracile	Uridine 5' phosphate

A. — ARN SOLUBLE (s ARN)

a) *Localisation*

Si on soumet un homogénat de tissus animaux ou un extrait bactérien à une centrifugation de 2 heures à 100 000 g, on obtient un surnageant dans lequel on précipite à pH 5 un ARN de faible poids moléculaire. Nous verrons que cet ARN est le seul à avoir la propriété de fixer des acides aminés. On l'a appelé ARN soluble par suite de sa localisation cytoplasmique ou encore ARN accepteur (1) ARN transfert (2) dans le but de caractériser son rôle.

Il a été mis en évidence dans les cellules animales (3) bactériennes (4) et les levures (5). Il représente de 5 à 20 p. 100 des acides nucléiques.

b) *Extraction et purification*

On peut envisager de l'extraire du surnageant à 100 000 g des homogénats et extraits cellulaires par déprotéinisation au phénol (6). On peut également l'extraire avec tous les autres acides nucléiques des cellules entières après lyse ou broyage, par déprotéinisation au phénol. On devra ensuite fractionner les divers acides nucléiques en utilisant différentes méthodes.

On peut envisager de séparer les ARN des autres acides nucléiques tout d'abord par chromatographie sur cellulose modifiée (DEAE par exemple) ou par extraction par le chlorure de sodium (7). Ces méthodes ne permettent pas de le séparer de l'ADN ; on peut alors compléter la purification par précipitation fractionnée à l'isopropanol (8) ou par action de la désoxyribonucléase. Un autre type de purification a été suggéré récemment en introduisant le principe de la filtration moléculaire sur gel de dextrane (9) qui permet de séparer les petites molécules des grosses. Enfin

la chromatographie sur colonne de kieselguhr imprégnée de sérum albumine méthylée (10) permet d'éliminer des fractions analogues au s ARN mais biologiquement différentes (11). On a pu signaler des ARN ayant des caractéristiques de tailles voisines de celles du s ARN mais n'ayant pas la propriété de fixer des acides aminés (12). A partir de ces différentes méthodes, des procédés de préparation ont été proposés en vue d'obtenir des quantités importantes de s ARN à partir de la levure de boulangerie (5), *Escherichia coli* (8), foie de rat (13).

c) Composition

L'hydrolyse alcaline d'un ARN libère les nucléotides sous des formes différentes suivant leur position dans la chaîne. Les nucléotides intérieurs de la chaîne sont libérés sous forme $-(2'-3')$ monophosphate ; les nucléotides de l'extrémité présentant un phosphate en 5' sont libérés sous forme de $(2'-3')-5'$ diphosphate ; les nucléotides de l'extrémité présentant une fonction $-OH$ libre en 3' sont libérés sous forme de nucléosides (fig. 1).

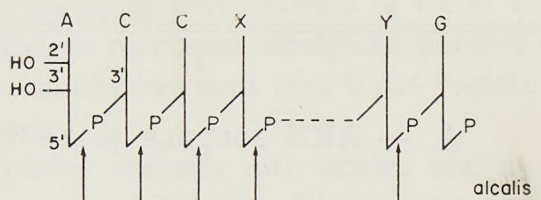


FIG. 1. — Structure primaire et hydrolyse d'un ARN-transfert

Chaque nucléotide est représenté par sa base (C, G, A, X,...), par son ribose avec les positions 3' et 5', et par le phosphate reliant une position 3' sur le ribose à la position 5' du ribose suivant. L'hydrolyse se fait au niveau de la liaison 5' et donne naissance à des nucléotides monophosphates 3' et 2' par isomérisation.

Lorsqu'on hydrolyse du s ARN de levure ayant atteint la phase stationnaire depuis peu de temps, on obtient les résultats rassemblés dans le tableau 2. Parmi les diphosphates on obtient essentiellement du GDP (14) : il semble bien que l'extré-

TABLEAU 2

Nucléosides et nucléotides libérés par hydrolyse alcaline à partir du s ARN de levure stationnaire

AMP	10	Adénosine	0,440
CMP	12,5	Cytidine	0,086
GMP	14,5	Uridine	0,084
UMP	8,45	Guanosine	0,113
GDP	0,522		

Résultats exprimés relativement à la quantité d'adénosine (2', 3') monophosphate, prise égale à 10.

mité 5' phosphate de la chaîne soit de la forme $pG pX...$ (15, 16). Les nucléosides, qui rendent compte de l'extrémité (3')-OH, comprennent essentiellement de

l'adénosine et de la cytidine ainsi que de la guanosine et de l'uridine. Or on peut montrer que les acides aminés se fixent sur le s ARN au niveau d'un résidu AMP et que ce résidu, qui a ses positions 2' et 3'-OH non estérifiées (17, 18), est terminal. Ces résultats traduisent le fait que tout le s ARN n'est pas de l'ARN-transfert et de plus que tout l'ARN-transfert n'est pas actif puisque ne se terminant pas par de l'AMP sur lequel viennent se fixer les acides aminés.

En dehors des quatre principaux nucléotides, dont les rapports sont caractéristiques de l'espèce et du s ARN, on trouve des nucléotides atypiques en quantités non négligeables. On a pu mettre en évidence le 5 ribosyl-uracile, le thymine ribotide et diverses purines méthylées. Seul le s ARN, à la différence des autres ARN de la cellule, présente cette particularité (19, 20, 21, 22).

d) *Structure*

La composition du s ARN révélée par les monophosphates présente deux caractéristiques. D'une part le rapport $\frac{\text{AMP} + \text{UMP}}{\text{GMP} + \text{CMP}}$ est compris pour toutes les espèces entre 0,60 et 0,67. D'autre part les rapports $\frac{\text{UMP} + \text{CMP}}{\text{AMP} + \text{GMP}}$ sont voisins de 1. Ces valeurs font penser à un appariement possible des bases complémentaires liées par des liaisons hydrogène. Or, le s ARN présente un spectre de diffraction des rayons X analogue à celui de l'ADN, ce qui conduit à proposer pour le s ARN une structure en double hélice de la chaîne qui se replierait sur elle-même (23) et qui correspondrait à l'appariement des bases complémentaires. Cette structure pourrait expliquer la résistance du s ARN à la phosphorolyse (24). La structure en double hélice pourrait d'ailleurs n'être pas parfaite ou ne pas intéresser toute la molécule (25).

Le s ARN est une chaîne comprenant 80 à 100 nucléotides (26, 27, 28, 15), ce qui permet de lui attribuer une masse moléculaire de l'ordre de 25 000 à 30 000 et une constante de sédimentation de l'ordre de 4 S (29, 30).

e) *Spécificité*

Il est apparu qu'un acide aminé seul ne pouvait saturer tous les sites accepteurs du s ARN, mais qu'il existait pour chacun d'eux des sites accepteurs propres (3, 4, 31) ; comme il n'existe qu'un site par chaîne de s ARN (l'AMP terminal), on peut penser qu'il existe pour chaque acide aminé un s ARN spécifique. On a essayé de séparer les différents s ARN par distribution à contre-courant (32), par des méthodes chimiques (33, 34, 35) et il a été signalé que pour les s ARN spécifiques de la thréonine et de la leucine, il semblait exister plus d'une espèce moléculaire (36). On a purifié un certain nombre de s ARN spécifiques (37) ; leur composition varie de l'un à l'autre mais présente les mêmes caractéristiques que celle de la totalité des s ARN.

L'incorporation de CMP et AMP en bout de chaîne des s ARN a été signalée par différents auteurs (38, 39, 40, 41). Cette incorporation ne peut pas être assimilée à une synthèse proprement dite. On a pu montrer que tous les ARN-transfert présentaient une séquence terminale : -acide cytidylique-acide cytidylique-acide adénylique (-pC pC pA) (17, 18, 26). Une incubation prolongée à 37° du s ARN

dans la fraction cytoplasmique supprime cette séquence et la fixation des acides aminés ne peut se produire qu'après qu'elle ait été reconstituée (42). Il est possible qu'un seul enzyme soit responsable de la fixation de ces trois nucléotides (43). On a pu déterminer le quatrième nucléotide de la chaîne (le premier après la séquence terminale $-pC\ pC\ pA$) (44, 45) ; il ne semble pas être le même pour tous les s ARN spécifiques puisque dans deux cas seulement sur trois il s'agit de l'AMP.

f) *Synthèse*

On peut admettre que la synthèse du s ARN se fait en deux étapes (46) : tout d'abord synthèse de la chaîne spécifique de chaque ARN-transfert, ensuite fixation de la séquence terminale commune — $pC\ pC\ pA$. La synthèse de la chaîne polynucléotidique est soumise au contrôle de l'ADN puisque on a pu montrer que l'inhibition des synthèses d'ARN dépendantes de l'ADN arrête la synthèse du s ARN (47). En outre, on a pu mettre en évidence des séquences d'ADN complémentaires de celles du s ARN (48). Récemment, on a pu montrer que la méthylation des bases du s ARN a lieu après que la chaîne polynucléotidique ait été synthétisée (49).

Un autre fait avait été signalé (14, 50, 51, 52) : il semble que au moins l'AMP terminal soit soumis à un renouvellement. Nos résultats (53) apportent la preuve que ce nucléotide terminal n'intervient pas dans la synthèse des protéines et nous pouvons nous demander si ce renouvellement n'est pas en fait lié à la régulation de la synthèse des ARN dans lequel le s ARN semble être impliqué (54, 55).

B. — ARN DES RIBOSOMES

a) *Localisation*

Lorsqu'on examine le culot obtenu par centrifugation à 100 000 g d'un homogénat de tissu ou d'un extrait de cellules, on observe qu'il est formé de particules de ribonucléoprotéines. Leur taille varie avec la concentration en ions Mg^{++} (56). Dans toutes les cellules ces particules de ribonucléoprotéines sont semblables (57).

Les progrès de la microscopie électronique ont permis la mise en évidence dans les cellules animales d'un système de doubles lamelles formant un réticulum endoplasmique sur lequel sont alignées des particules de ribonucléoprotéines (58, 59). La fraction de ribonucléoprotéines, appelée fraction microsomale, provient de ce réticulum (60). Les particules de ribonucléoprotéines sont appelées ribosomes (61). Dans les cellules bactériennes, les ribosomes sont libres à l'intérieur de la cellule, une partie seulement est liée à la membrane externe ; il n'existe pas de réticulum dans ces cellules.

b) *Extraction et purification*

L'extraction des ARN des ribosomes doit être précédée par un lavage des ribosomes dans de faibles concentrations de Mg^{++} afin d'éliminer d'autres ARN qui pourraient y rester fixés. Ces ARN sont déprotéinisés au phénol ; on peut les séparer des ARN de plus faible poids moléculaire (9), par filtration sur gel de

dextrane, par chromatographie sur colonne de kieselguhr imprégnée de sérum albumine méthylée (10) ou par centrifugation dans un gradient de concentration de saccharose (62).

On peut mettre en évidence au moins deux types de molécules ayant respectivement des constantes de sédimentation de 15 à 20 S et de 20 à 30 S suivant les espèces. Ces ARN représentent 60 à 70 p. 100 de la masse des ribosomes et jusqu'à 20 p. 100 du poids sec des cellules.

c) *Propriétés*

Nous verrons que les ribosomes sont le lieu où se forment les chaînes polypeptidiques. Des résultats récents ont montré que l'unité fonctionnelle n'est pas le ribosome lui-même mais des groupes de ribosomes (63, 64).

La composition de l'ARN ribosomal est assez constante d'une espèce à l'autre alors que celle des autres acides nucléiques varie dans de plus larges limites (65, 66).

La synthèse se fait sous le contrôle de l'ADN ainsi que le prouve la mise en évidence de séquences de l'ADN complémentaires de celles de l'ARN ribosomal (67).

C. — ADN

a) *Propriétés*

Dans les cellules à noyau figuré et les cellules bactériennes on a mis en évidence un acide nucléique dont le sucre est du désoxyribose. Sa composition est constante pour toutes les cellules d'une espèce donnée et en est caractéristique. Sa quantité par cellule est constante. Il s'agit d'une très grosse molécule (poids moléculaire de l'ordre de 10^8) qui est très fragile (le passage à travers une pipette suffit pour rompre la molécule).

b) *Structure*

Les études aux rayons X ont montré que la structure de la molécule était très régulière, en hélice (68). L'hypothèse proposée par WATSON et CRICK (69) de la double hélice rend compte des données physiques et chimiques, elle est maintenant parfaitement vérifiée. L'ADN est composé de deux chaînes polynucléotidiques enroulées en hélice et maintenues en place par des liaisons hydrogène existant entre bases complémentaires (adénine et thymine, guanine et cytosine). On peut séparer les deux chaînes et reformer l'hélice à partir de brins isolés (70).

c) *Synthèse*

La synthèse de nouvelles molécules de l'ADN se fait à partir des désoxyribonucléosidetriphosphates au contact de l'ADN grâce à l'enzyme de Kornberg qui copie chaque brin de l'hélice et donne naissance à deux molécules à partir d'une seule.

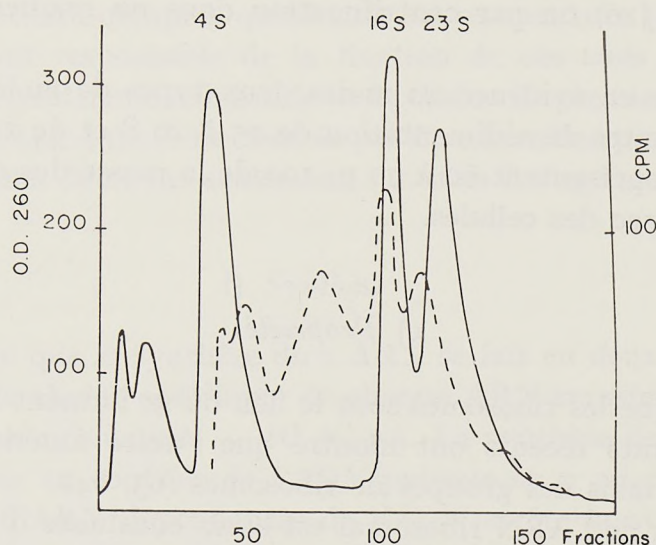


FIG. 2. — Chromatographie sur colonne de kieselguhr imprégnée de sérum albumine méthylée de l'ARN total d'*Escherichia coli* 200 PS après incorporation en phase exponentielle de ^{14}C -uracile pendant 30 secondes. On note la présence de l'ARN-transfert 4 S, des ARN ribosomaux 16 S et 23 S, de l'ARN à marquage rapide mis en évidence par sa radioactivité. L'ADN a été détruit par désoxyribonucléase

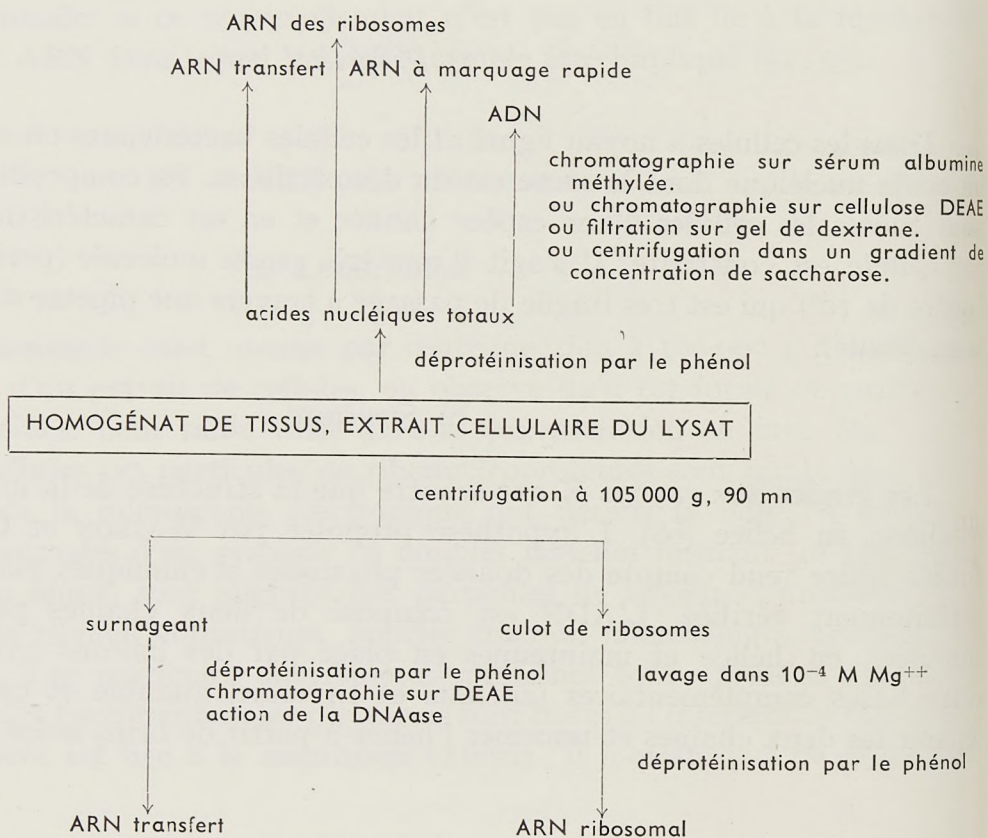


FIG. 3. — Préparation des ARN

D. — ARN A MARQUAGE RAPIDE

Les ARN que nous avons examinés sont stables, c'est-à-dire qu'une fois synthétisés dans une cellule normale ils ne disparaissent pas.

a) *Mise en évidence*

VOLKIN et ASTRACHAN (71) ont reconnu chez des bactéries infectées par un bactériophage une fraction d'ARN dont le renouvellement est rapide. Cet ARN a été reconnu également dans des cellules normales bactériennes (72) et animales (73).

Cet ARN peut être mis en évidence par des incorporations de précurseurs radioactifs pendant des temps très courts (71) (fig. 2). En effet, dans le cas des bactéries, sa synthèse et sa dégradation sont rapides (pendant chaque minute 70 p. 100 de l'ARN synthétisé sont de l'ARN instable) mais il ne représente que 2 à 3 p. 100 de l'ARN de la cellule (74) : donc pendant un temps très court, la plus grande partie de l'ARN synthétisé est cet ARN instable ; il est dégradé en produits acidosolubles (74). Sa durée de demi-vie est de l'ordre de deux minutes (47). On peut l'extraire avec les autres ARN après déprotéinisation au phénol (fig. 3).

b) *Propriétés*

Sa taille est très hétérogène ; sa constante de sédimentation varie de 4 à 30 S (75). Sa composition est analogue à celle de l'ADN (76) (en notant que la thymine est remplacée par l'uracile). Il forme avec l'ADN des hélices mixtes dues à des liaisons hydrogènes entre bases complémentaires (77). *In vivo* on a obtenu de tels complexes (78).

Cet ARN peut s'associer aux ribosomes sites cellulaires de la synthèse des protéines (79) et même plus précisément aux groupes de ribosomes biologiquement actifs (80).

c) *Synthèse*

Divers auteurs (81, 82) ont pu isoler à partir de cellules animales et bactériennes un enzyme synthétisant un ARN semblable à l'ADN qui sert de modèle. Cet ARN a les propriétés de l'ARN instable que nous venons d'étudier. On a ainsi la preuve que cet ARN instable est synthétisé au contact de l'ADN par un système enzymatique présent dans toutes les cellules.

II. — MÉCANISMES DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

GÉNÉRALITÉS

On peut se poser trois genres de questions au sujet de la synthèse protéique.

1. La cellule dispose des acides aminés qu'elle trouve dans le milieu extérieur ou qu'elle synthétise. A partir de ces unités comment forme-t-elle des chaînes com-

prenant 50, 100 ou plus de ces unités ? Quels sont les mécanismes donnant naissance aux liaisons peptides entre acides aminés ?

2. On a montré qu'une protéine donnée constitue une espèce moléculaire que l'on peut isoler et purifier (83). La détermination de la séquence des acides aminés a été faite maintenant pour un certain nombre de protéines (insuline, myoglobine) : elle est constante pour chacune d'entre elles. C'est cette séquence d'acides aminés qui entraîne pour la protéine les caractéristiques biochimiques qui lui sont propres. Comme il existe pour une espèce donnée et pour une protéine donnée une constante absolue de composition, on a été amené à penser que celle-ci était en relation avec le matériel génétique des cellules. On peut se demander quels mécanismes sont responsables au cours de la synthèse des protéines de cette spécificité.

3. L'étude des enzymes adaptatifs chez les bactéries a permis depuis longtemps de constater qu'une cellule, suivant les conditions de milieu dans lequel elle se trouve, possède un équipement enzymatique variable. La cellule contient un certain nombre de potentialités qui ne se manifestent que lorsque le milieu l'exige. Par conséquent, les manifestations phénotypiques d'une cellule ne traduisent à un moment donné qu'une partie du génotype. On peut se demander quels mécanismes fixent l'équipement enzymatique de la cellule à chaque instant en réglant la quantité de chacune des protéines synthétisées.

Nous nous trouvons en réalité devant des problèmes très complexes, et nous allons examiner les grandes lignes des conclusions auxquelles on est parvenu, en schématisant volontairement cet exposé. En effet, on peut donner à chacune des trois questions fondamentales une réponse qui n'est pas indépendante de celle donnée aux autres questions. On notera en référence les faits expérimentaux les plus nets qui ont conduit aux conclusions proposées.

A. — MÉCANISMES ENZYMATIQUES

Les mécanismes enzymatiques qui donnent naissance aux liaisons peptidiques ne sont en aucune façon assimilables aux réactions inverses de l'hydrolyse de ces liaisons par les protéases ou les peptidases. La synthèse d'une liaison peptidique est une réaction endergonique qui doit être couplée avec une réaction exergonique (par exemple, l'hydrolyse d'une liaison riche de l'ATP).

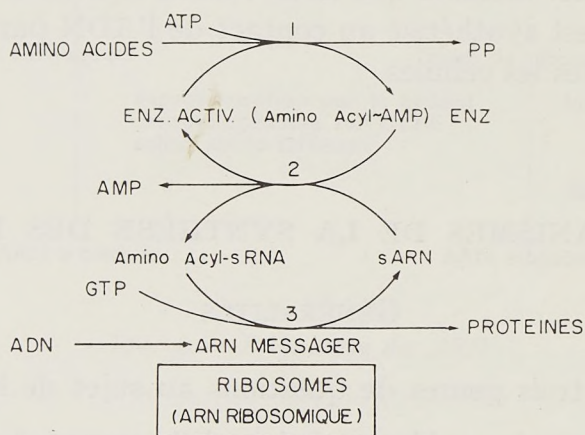


FIG. 4. — Schéma de HOAGLAND-ZAMECNICK : Biosynthèse des protéines

Nous examinons tout d'abord le schéma d'ensemble dont nous reprendrons ensuite les différentes étapes (fig. 4) :

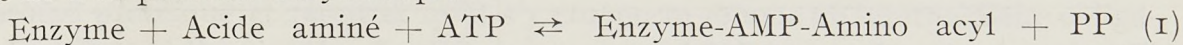
- a) Chaque acide aminé est activé sous forme d'amino-acyl adénylate.
- b) Chaque acide aminé activé est fixé sur un ARN-transfert pour donner un amino-acyl-s ARN.
- c) Cet amino-acyl-s ARN vient déposer son acide aminé à l'extrémité carboxylique de la chaîne polypeptidique en voie de synthèse.

Il s'agit là du schéma d'HOAGLAND et ZAMECNIK. Les chercheurs bostoniens l'ont proposé comme hypothèse de travail. Ses diverses étapes ont été peu à peu précisées, et si divers points paraissent encore obscurs, il est à peu près adopté par tous. On sait en particulier avec certitude que les enzymes activant les acides aminés ou que l'ARN-transfert participent à la synthèse des protéines enzymatiques.

1°) *Activation des acides aminés*

a) *Réaction d'activation.*

Il s'agit d'un déplacement du pyrophosphate de l'ATP par le carboxyle de l'acide aminé. L'activation conduit à la formation d'un aminoacyl adénylate qui reste lié à la protéine enzymatique.



Cet étape est en accord avec les vues de LIPMANN qui, en 1941, avait émis l'hypothèse que la première étape de la synthèse protéique devait être une activation des acides aminés (84).

Cette réaction se fait aux dépens de la deuxième liaison phosphate de l'ATP ; elle est réversible (85) ; elle donne naissance à des composés activés qui, en présence d'hydroxylamine, donnent des amino-acyl-hydroxamates (86). L'activation porte sur le carboxyle des acides aminés (3) qui proviennent du pool interne de la cellule.

b) *Enzymes activants.*

Lorsqu'on soumet un homogénat de cellules, après avoir éliminé les membranes, les débris cellulaires et les cellules intactes, à une centrifugation de 2 heures à 100 000 g on obtient un liquide surnageant dans lequel se trouvent les enzymes activants ; cette fraction active est précipitée à pH 5 (86). Elle peut être redissoute et retrouve son activité en présence d'ATP ou d'un système générateur d'ATP.

La réversibilité de la réaction (1) permet de mesurer l'activité des enzymes activants en déterminant l'échange $^{32}\text{PP-ATP}$ qui dépend de la présence des acides aminés. L'importance de cet échange augmente avec l'addition successive des différents acides aminés. Il n'y a donc pas de compétition entre les acides aminés pour un même enzyme. En effet, il existe pour chacun d'eux un enzyme spécifique. Dans une cellule donnée, on a observé de grandes différences dans l'activité de ces différents enzymes (34, 87, 88). Dans le travail initial de HOAGLAND et coll. (3) quelques acides aminés seulement étaient activés. On sait maintenant que l'absence d'activation de certains acides aminés résultait en fait de l'instabilité des enzymes correspondants.

Un certain nombre d'enzymes activants spécifiques ont été purifiés : enzyme activant la méthionine à partir de la levure (89), enzyme activant la tyrosine à

partir du pancréas de porc (90), les enzymes activant la leucine, la valine, l'isoleucine et la méthionine à partir d'*Escherichia coli* (91). L'enzyme activant le tryptophane a été purifié à partir du pancréas de bœuf (92) ; il est très spécifique du tryptophane. Un certain nombre d'analogues du tryptophane peuvent être incorporés dans les protéines des bactéries et des tissus animaux, alors que d'autres ne le sont pas (93). Or seuls sont activés les analogues du tryptophane qui peuvent être incorporés (94). Cette observation est en faveur de l'hypothèse selon laquelle les enzymes activants interviendraient obligatoirement dans la synthèse protéique, puisque seuls sont incorporés les analogues du tryptophane susceptibles d'être activés. La spécificité des enzymes activants est très étroite mais variable de l'un à l'autre (91) ; ainsi les enzymes activant la méthionine et la leucine n'acceptent comme substrat que les acides aminés correspondants. Cependant l'enzyme activant l'isoleucine forme le valyl-adénylate avec une vitesse qui est la moitié de celle trouvée pour la formation de l'isoleucyl-adénylate.

TABLEAU 3

Composition de différents ARN de Escherichia coli ML 308. Nucléotides libérés par hydrolyse alcaline

	ARN du surnageant	ARN 16 S	ARN 23 S	Composition de l'ADN
AMP	10	10	10	10
CMP	15,4	9	8,7	6,1
GMP	16,7	13,2	12,9	6,1
UMP + TMP	10,2	9	9	10
5 Ribosyl-UMP	1,3	—	—	—
(2', 3') 5' GDP	0,61	—	—	—
Purine/Pyrimidine	1,04	1,29	1,29	1

Résultats exprimés relativement à la quantité d'adénosine (2', 5') monophosphate prise égale à 10. La composition de l'ADN est donnée à titre de comparaison.

On ne sait rien sur la structure de ces enzymes. Leur centre actif doit présenter un groupement SH puisque leur activité est protégée par le glutathion réduit (2) ou le mercapto-éthanol (92). L'aminoacyl-adénylate formé reste lié à l'enzyme et n'a pas pu être détecté sous forme libre (88). Ces substances pouvant réagir avec un acide aminé (95) et former au hasard une liaison peptide, on peut penser (96) que la liaison étroite avec l'enzyme protège l'aminoacyl-adénylate pour lui permettre de participer à la constitution de liaisons peptidiques spécifiques. L'existence des aminoacyl-adénylates a cependant été prouvée (97) en libérant (par dénaturation de l'enzyme) le tryptophanyl-adénylate du complexe préparé à partir d'une grande quantité d'enzyme activant le tryptophane.

2°) Transfert de l'acide aminé activé sur une chaîne polynucléotidique

a) Rôle d'un ARN cytoplasmique.

HULTIN avait déjà signalé (98) que dans un homogénat en l'absence d'ATP les acides aminés peuvent s'accumuler sous une forme intermédiaire entre la forme libre et les protéines. HOAGLAND montre que la fraction du surnageant précipitée

à pH 5 contient 5 p. 100 d'acide ribonucléique (3) qui, incubé avec de l'ATP, de la ^{14}C -leucine et les enzymes activants, devient à son tour radioactif. Cet ARN joue le rôle d'un transporteur intermédiaire sur lequel les acides aminés sont fixés par leur carboxyle, car le complexe ^{14}C -leucine-ARN incubé dans un homogénat transfère la ^{14}C -leucine aux protéines (31). Il s'agit de l'ARN soluble (s ARN).

b) *Enzymes responsables.*

Comment se fait la fixation des acides aminés sur le s ARN? Il semble bien que les enzymes activants soient responsables de cette fixation. Aussi BERG propose d'appeler ces enzymes : aminoacyl ARN synthétases. Il faut noter que l'enzyme activant ne transfère que l'acide aminé pour lequel il est spécifique ; ainsi, si l'enzyme activant la leucine peut activer la valine comme nous l'avons vu, il ne transfère pas la valine sur le s ARN (91). On a pu montrer (99) que le transfert de l'acide aminé sur le s ARN est une réaction réversible. Il semble qu'il y ait interaction entre le s ARN et l'enzyme (100) et que seul l'acide aminé soit transféré alors que l'AMP est libéré (101).

c) *Le s ARN intermédiaire obligatoire dans la synthèse des protéines.*

On peut se poser la question de savoir si le s ARN joue un rôle important dans la synthèse protéique et montrer qu'il s'y comporte comme un intermédiaire obligatoire. En effet, si l'on incube des ^{14}C -aminoacyl-s ARN dans un homogénat de foie de rat, on observe un transfert quantitatif des acides aminés dans les protéines. La quantité de radioactivité ainsi transférée n'est pas modifiée par l'addition d'un excès d'acides aminés libres non marqués (102, 103), ce qui implique le passage direct des acides aminés du s ARN aux protéines. De plus, si on mesure le flux d'acides aminés qui sont ainsi transférés, on trouve un bon accord entre ce chiffre et la quantité d'acides aminés incorporés dans les protéines (52). Enfin, si on incube du s ARN d'*Escherichia coli* chargé de ^{14}C -leucine dans un système extrait de réticulocytes de lapin, on peut montrer que la ^{14}C -leucine est incorporée dans de l'hémoglobine de lapin (104) ; ce qui permet de conclure à la participation du s ARN à la synthèse des protéines cytoplasmiques de la cellule et à la possibilité au s ARN d'une espèce de fonctionner dans un système extrait d'une autre espèce.

3°) *Formation des chaînes polypeptidiques sur les ribosomes*

a) *Rôle des ribosomes.*

Les premières études cinétiques d'incorporation des acides aminés dans les protéines cellulaires *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'incorporation se faisait dans toutes les fractions cellulaires mais surtout dans la fraction microsomale (105, 106). Plus précisément, on a pu montrer qu'au cours de la synthèse de la globine par les réticulocytes, il existait une étape intermédiaire où elle était liée à la fraction microsomale (107). Les résultats de CASPERSSON (108) et BRACHET (109), qui avaient remarqué que la capacité d'une cellule de synthétiser des protéines est liée à sa teneur en ARN, s'appliquent en réalité à l'ARN des ribosomes qui représente plus de 75 p. 100 des ARN de la cellule, puisque les ribosomes étant le lieu de la synthèse des protéines doivent être d'autant plus nombreux que la synthèse est active.

b) *Transfert des acides aminés sur les ribosomes.*

HOAGLAND avait mis en évidence le rôle des ribosomes en montrant que lorsqu'on les incube avec le surnageant à 100 000 g d'un homogénat de foie de rat avec des ^{14}C -amino-acyl-s ARN, ils deviennent radioactifs (110). Le système de transfert des acides aminés du s ARN aux ribosomes a été étudié : il comprend un enzyme de transfert (voir LIPMANN et coll., 111) qui ne fonctionne qu'en présence des ribosomes de la même espèce (102); il semblerait qu'il en existe plusieurs spécifiques de différents acides aminés (112). Le GTP est indispensable (113, 114) ; le glutathion ou des groupements -SH seraient utiles (111), ils agiraient comme des activateurs (115).

c) *Synthèse de chaînes peptidiques.*

La synthèse de la molécule de protéine se fait à partir de l'extrémité aminée libre vers l'extrémité carboxylique libre par additions successives d'acides aminés (116, 117). On peut donc penser que nous trouvons sur les ribosomes des chaînes polypeptidiques en croissance, qui se complètent peu à peu et sont libérées en fin de compte dans le cytoplasme sous forme de protéines solubles. Le temps de synthèse d'une molécule d'hémoglobine dans les conditions normales de fonctionnement des réticulocytes est de l'ordre de la minute. Nous comprenons que l'omission d'un seul acide aminé puisse interrompre toute synthèse puisque, dans ce cas, la croissance des chaînes polypeptidiques s'arrête à l'endroit où cet acide aminé doit être incorporé.

Nous avons testé jusqu'à présent le système enzymatique décrit par son aptitude à incorporer des acides aminés dans les protéines. Cependant nous avons déjà la certitude que le s ARN est un intermédiaire obligatoire de la synthèse des protéines solubles de la cellule. De plus, la réalisation de systèmes *in vitro* contenant les constituants que nous avons décrits a permis de déceler l'incorporation des acides aminés dans des protéines spécifiques de la cellule. Ainsi, parmi les protéines synthétisées dans le système présent, dans un homogénat de foie de rat on peut identifier le sérum-albumine (118) ; le système décrit par NIREMBERG et MATTHAEI (119) est capable de synthétiser la protéine spécifique du coliphage f_2 (120). Nous avons là des preuves que ce système accroche les acides aminés dans un certain ordre et est responsable de la synthèse des protéines spécifiques des cellules.

4°) *Autres systèmes d'incorporation des acides aminés dans les liaisons peptidiques*

Nous venons d'examiner le système auquel on attribue la synthèse des protéines cytoplasmiques des cellules. Mais il existe d'autres systèmes qui permettent l'incorporation des acides aminés dans des liaisons peptides. Ainsi LACKS et GROS (52) ont extrait le pool des aminoacyl-s ARN et ont estimé la vitesse de passage à travers ce pool. Ils ont pu montrer que les acides aminés fixés sur le s ARN sont les précurseurs des protéines formées sur les ribosomes ; mais ils sont arrivés à la conclusion que la quantité d'acides aminés incorporés par l'intermédiaire du s ARN ne rendait pas compte de la totalité des acides aminés incorporés dans la cellule. Par conséquent, il faut admettre que d'autres mécanismes interviennent. ROBERT et coll. étaient arrivés aux mêmes conclusions (121).

a) *Peptides de membranes.*

STROMINGER (122) a étudié le système responsable de la synthèse des peptides de membranes ; chez *Staphylococcus aureus*, il s'agit d'un système capable de synthétiser un certain nombre de liaisons peptides aux dépens de quelques acides aminés. Ce système est inhibé par la pénicilline et ses dérivés, alors que le système de HOAGLAND-ZAMECNICK ne l'est pas ; et inversement, le chloramphénicol qui inhibe ce dernier n'empêche pas l'incorporation des acides aminés dans les peptides de membranes (123).

b) *Systèmes divers.*

On peut également citer les systèmes incorporant des acides aminés dans des peptides comme le glutathion (124), ou le système de BELJANSKI où l'incorporation d'acides aminés dans des liaisons peptides peut se faire aux dépens de la première liaison phosphate des ribonucléosides triphosphate (125).

c) *Énergie et transpeptidation.*

Par ailleurs, nous avons vu que le système d'HOAGLAND-ZAMECNICK ne pouvait fonctionner qu'en présence de liaisons riches en énergie. Aussi la synthèse d'une liaison peptide doit être couplée avec des réactions fournissant de l'énergie (par exemple des phosphorylations oxydatives) ; si l'on supprime ces phénomènes, la synthèse protéique cesse.

On peut cependant observer la création d'une liaison peptide nouvelle à partir d'autres liaisons peptides déjà existantes (126) ; il s'agit de phénomènes de transacylation qui ont peu d'intérêt puisqu'il ne s'agit pas d'une synthèse *de novo*. Un certain nombre de systèmes d'incorporation qui ont été proposés ne sont pas exigeants en énergie, il faut penser que, dans ces cas-là, des phénomènes de transpeptidation interviennent. Récemment (127), on a pu montrer que, dans des mitochondries, lorsque l'incorporation d'acides aminés ne dépendait pas de la présence d'énergie, il n'y avait pas synthèse *de novo* de liaison peptide, mais que des transpeptidations intervenaient.

B. — SPÉCIFICITÉ DES PROTÉINES

1^o) *Structure des protéines*a) *Structures et activité.*

Les études actuelles montrent que les propriétés biochimiques des protéines sont liées à leur structure. Or, les structures secondaires et tertiaires (c'est-à-dire la structure dans l'espace de la molécule) semble être entièrement déterminées par la structure primaire de la protéine (c'est-à-dire l'enchaînement des acides aminés de la chaîne polypeptidique) (128). En effet, si l'on dénature dans certaines conditions une protéine (ce qui veut dire qu'elle a perdu ses structures secondaire et tertiaire et ses propriétés biochimiques tout en conservant sa constitution chimique), elle peut recouvrer par renaturation sa structure et son activité. La phosphatase alcaline d'*Escherichia coli*, qui est active sous forme de dimère, peut être dénaturée

et transformée en monomère. On peut reconstituer l'enzyme en reformant des dimères à partir des monomères (129) ; tous les traitements qui détruisent la structure tertiaire de la ribonucléase du pancréas du bœuf détruisent son activité (130). Ainsi la structure des protéines et leur activité enzymatique ne dépendent en dernière analyse que de la séquence des acides aminés.

b) *Matrice et matériel génétique.*

On peut trouver chez des espèces voisines la même protéine enzymatique différant dans sa structure primaire par quelques-uns des acides aminés seulement et dans ses propriétés par des comportements bien différents. Il faut donc se poser la question de savoir comment, pour une espèce donnée, le même enchaînement d'acides aminés peut se reproduire indéfiniment. Le problème est d'autant plus important qu'il existe dans une cellule un très grand nombre de protéines présentant des séquences d'acides aminés entièrement différentes les unes des autres. Comme il ne semble pas que la synthèse d'une protéine puisse se faire à partir d'unités préexistantes (131), on a donc été amené à supposer que chaque protéine se forme sur une matrice spécifique contre laquelle viennent successivement se placer les acides aminés. Ces matrices se trouveraient dans les ribosomes puisque c'est à leur niveau que se fait la synthèse des différentes protéines spécifiques d'une cellule.

On sait, depuis les études sur la transformation des bactéries (132) ou sur les bactériophages (133), que l'ADN est responsable dans la cellule de la spécificité de ses constituants et de ses enzymes (134). On dit qu'il contient l'information nécessaire aux synthèses de la cellule. Si nous admettons que la synthèse se fait au niveau des ribosomes au contact d'une matrice et que l'ADN règle la spécificité des protéines, on peut se demander comment ces deux faits sont compatibles et qu'elle est la nature de la matrice.

2°) *ARN messenger*

On avait pensé que les ribosomes étaient eux-mêmes des copies de l'ADN, à la seule différence près que le ribose remplaçait le désoxyribose et l'uracile la thymine. On faisait l'hypothèse que, à chaque protéine, correspondait un ribosome formé sous le contrôle du gène correspondant de l'ADN. Mais cette hypothèse ne rendait pas compte d'un certain nombre de faits : cinétiques d'induction des enzymes, stabilité et homogénéité des ribosomes (135).

MONOD et JACOB ont été ainsi amenés à postuler la présence d'un ARN distinct de l'ARN ribosomal auquel ils donnent le nom d'ARN messenger. Cet ARN doit présenter une composition en bases analogues à celle de l'ADN, pouvoir s'attacher aux ribosomes, se renouveler rapidement et être de taille assez variable (136). L'existence d'un tel ARN semblait prouvée par des expériences de GROS et NAONO (137, 138) avec le 5-fluoro uracile qui s'incorpore seulement dans l'ARN à la place de l'uracile et se comporte différemment ; dès l'addition de cet analogue, dont l'incorporation produit des ARN anormaux, la synthèse de toutes les protéines de la cellule est modifiée, preuve qu'à chaque instant un ARN porte aux ribosomes l'information d'origine génétique nécessaire à la synthèse des protéines.

L'existence d'un ARN ayant certaines des propriétés prévues pour l'ARN messenger avait d'ailleurs été décelée auparavant par VOLKIN et ASTRACHAN (71) ;

les propriétés de l'ARN à marquage rapide que nous avons décrit sont conformes aux hypothèses faites et on a de bonnes raisons de penser que cet ARN est l'ARN messager de MONOD et JACOB.

Ainsi au contact de l'ADN, qu'on sait être le support de l'information dans la cellule, se synthétise un ARN : c'est le « programme » que vont exécuter les ribosomes. On a pu identifier la matrice dont on avait supposé l'existence.

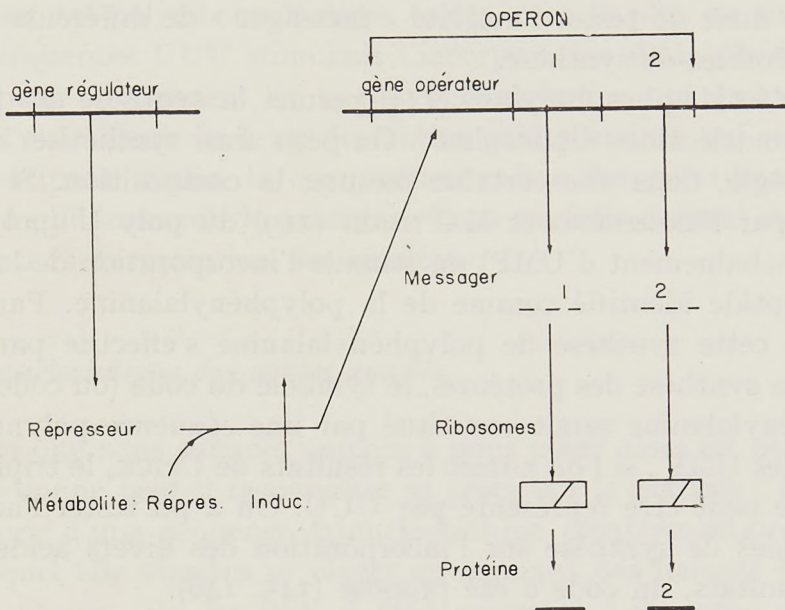


FIG. 5. — Schéma de la régulation de la synthèse des protéines (d'après JACOB et MONOD)

3°) Déchiffrage du code

a) Nature du code et colinéarité du matériel génétique.

L'ADN et l'ARN formé à son contact sont des chaînes formées à partir de quatre nucléotides ; or, les protéines sont formées à partir de vingt acides aminés. Il faut donc admettre que le message contenu dans les chaînes polynucléotidiques est inscrit grâce à un code qui fait correspondre à chaque acide aminé une séquence nucléotidique le représentant. Comme l'ordre des acides aminés sur une chaîne polypeptidique est linéaire, il faut admettre que la structure du matériel génétique, qui est copié pour donner naissance à l'ARN messager, est elle-même linéaire afin de pouvoir faire correspondre aux séquences nucléotidiques successives de l'ADN les acides aminés de la protéine. Cette hypothèse a été vérifiée par BENZER (139).

CRICK a proposé un code dans lequel chaque acide aminé est représenté par trois nucléotides (140, 141). On peut calculer qu'il existe 64 triplets différents possibles, or 20 sont suffisants, il faut donc admettre avec CRICK qu'un certain nombre de séquences n'ont pas de sens ou qu'un acide aminé peut être représenté par plusieurs triplets, le code est alors dit dégénéré. Le code proposé est dit à base 3, sans virgule ni recouvrement, c'est-à-dire que chaque acide aminé est représenté par trois nucléotides sans que rien ne sépare deux triplets successifs et sans qu'aucun nucléotide ne soit commun à deux triplets consécutifs. La vérification de ces hypothèses a été faite récemment par CRICK (142).

b) *Systèmes in vitro et ARN messenger.*

On peut préparer des extraits de cellules bactériennes capables d'incorporer *in vitro* des acides aminés dans leurs protéines. Ces systèmes sont immédiatement inhibés par la ribonucléase tandis que l'addition de désoxyribonucléase ne modifie pas la vitesse initiale d'incorporation, mais assez rapidement en sa présence l'incorporation cesse. Elle peut reprendre avec l'addition d'ARN messenger (81, 143). Ce système permet donc de tester l'activité « messenger » de différents ARN et même de polyribonucléotides de synthèse.

La polynucléotide-phosphorylase (144) permet la synthèse des polynucléotides à partir des ribonucléotides diphosphate. On peut ainsi synthétiser des polynucléotides dont on règle, dans une certaine mesure, la composition. Si l'on ajoute au système décrit par NIREMBERG et MATTHAEI (119) du poly U (polyribonucléotide formé par un enchaînement d'UMP) on stimule l'incorporation de la phénylalanine dans un polypeptide identifié comme de la polyphénylalanine. Par conséquent, si l'on admet que cette synthèse de polyphénylalanine s'effectue par le mécanisme responsable de la synthèse des protéines, le symbole du code (ou codon selon CRICK) pour la polyphénylalanine serait constitué par une séquence polynucléotidique ne contenant que des UMP ; si l'on admet les résultats de CRICK, le triplet codant pour la phénylalanine peut être représenté par UUU. On a pu tester l'activité d'autres polyribonucléotides de synthèse sur l'incorporation des divers acides aminés et, à partir de ces résultats, un code a été proposé (145, 146).

c) *Éléments du code.*

L'examen des résultats du tableau 4 nous apporte la preuve que le code est dégénéré puisqu'on peut attribuer à la leucine, par exemple, deux triplets UUC et UUG. Par ailleurs U figure dans beaucoup de triplets ; si l'on calcule la composition que devrait avoir l'ADN codant pour toutes les protéines d'une cellule (147), on

TABLEAU 4

Alanine	CCG	Lysine.....	AAA, AAU, AAC, AAG
Arginine	CCG	Méthionine	UAG
Acide aspartique	ACA	Phénylalanine.....	UUU
Asparagine	UAC ou UAA	Proline	CCC, UCC, CCG, CCA
Cystéine.....	UUG ou UGG	Sérine.....	UUC et UCG
Acide glutamique	UAG, AAC, AAG	Thréonine.	AAC, ACC
Glycocolle.....	UGG	Tryptophane.....	UGG
Histidine	ACC	Tyrosine	UUA
Isoleucine	UUA	Valine	UUG
Leucine.....	UUC, UUG, UUA		

Éléments d'un code trinuécléotidique (d'après NIREMBERG et MATTHAEI).

L'ordre des nucléotides dans chaque triplet n'est pas défini. Les lettres A, G, U, C représentent respectivement les nucléotides monophosphate de l'adénosine, la guanosine, l'uridine et la cytidine.

trouve une teneur théorique en dAMP beaucoup plus élevée que celle obtenue dans la composition de l'ADN. Il faut donc admettre que nous n'avons là qu'une partie du code. Des éléments d'un code ne contenant pas U ont été proposés plus récemment (148, 149, 150) ce qui porte à plus de 40 le nombre de triplets significatifs connus. Il faut d'ailleurs noter que lorsqu'on ajoute au système de NIREMBERG et MATTHAEI des polyribonucléotides de synthèse, une faible partie seulement vient se fixer sur les ribosomes (10 p. 100) et joue par conséquent le rôle de « messenger », le reste étant dégradé. De plus, les polyribonucléotides testés avec le plus de succès présentent forcément des séquences UUU stimulant l'incorporation de la phénylalanine, aussi les peptides formés contiennent de la polyphénylalanine qui précipite facilement et joue le rôle d'entraîneur vis-à-vis des autres acides aminés qui sont alors décelés avec plus de certitude. Enfin, la composition même des polyribonucléotides n'est pas connue avec suffisamment de précision. Tous ces faits doivent donc nous rendre prudents quant à l'interprétation des résultats.

d) *Adaptateur nucléotidique des acides aminés.*

La question que nous sommes amenés à nous poser alors est celle-ci : comment un acide aminé donné peut-il reconnaître sa place sur la matrice ? Il faut admettre qu'il est solidaire d'une séquence trinuécléotidique complémentaire du triplet du code, contre lequel elle viendra se placer en formant des liaisons hydrogène entre bases complémentaires. En un mot, il faut envisager l'existence d'un adaptateur nucléotidique qui reconnaît la place de l'acide aminé sur la matrice. Le rôle de l'adaptateur est tenu par les s ARN spécifiques des différents acides aminés (151) : chargés d'acides aminés, ils doivent reconnaître leurs places le long de la matrice ; le rôle d'adaptateur du s ARN semble à l'heure actuelle assez bien élucidé.

Cependant, si nous examinons le rôle joué par le s ARN en tant qu'adaptateur, nous constatons que la molécule paraît trop volumineuse : 3 nucléotides pourraient suffire, 6 si nous tenons compte de la séquence terminale $-pC\ pC\ pA$ responsable de l'accrochage de l'acide aminé. Aussi certains auteurs ont pensé que seule une partie de la molécule fonctionnait comme adaptateur et que cette molécule pouvait se couper en deux ; certains faits sont compatibles avec cette hypothèse (152, 153, 154, 155). Cependant LIPMANN (111) semble avoir montré qu'après avoir effectué le transfert des acides aminés, le s ARN était toujours fonctionnel.

Le rôle d'adaptateur nucléotidique du s ARN a été mis en évidence en montrant qu'un type de molécule se comporte toujours de la même façon quel que soit le résidu d'acide aminé fixé. La cystéine fixée sur le s ARN peut être réduite par le nickel de Ranay (156) en alanine sans que le s ARN soit dégradé. On obtient un s ARN portant des résidus d'alanine. L'incorporation de ces résidus est stimulée par le poly UG qui ne stimule pas l'incorporation de l'alanine mais celle de la cystéine. Ce qui signifie que le s ARN, spécifique de la cystéine, se comporte quel que soit l'acide aminé comme l'adaptateur de la cystéine, et que l'alanine n'intervient pas dans le fonctionnement du s ARN. Par conséquent, à partir du moment où un acide aminé est fixé sur le s ARN, il perd sa spécificité propre et son incorporation dans les protéines dépend de la spécificité de la molécule de s ARN auquel il est fixé.

e) *Dégénérescence du code.*

Le rôle des s ARN dans le système décrit par NIREMBERG et MATTHAEI est également mis en évidence par l'incorporation de la phénylalanine à partir du ^{14}C -phényl-alanyl-s ARN qui est stimulée par le poly U (157). Mais surtout on a pu ainsi apporter la preuve exacte de l'existence d'un code dégénéré (c'est-à-dire qu'un acide aminé peut être représenté sur la matrice par plusieurs triplets). Si on fixe sur du s ARN d'*Escherichia coli* de la ^{14}C -leucine, on peut séparer par distribution à contre-courant deux fractions distinctes de ^{14}C -leucine. Le poly UG stimule l'incorporation de la leucine exclusivement à partir de l'une et le poly UC à partir de l'autre (158). Ces résultats confirment l'existence de deux triplets au moins codant pour la leucine et parallèlement démontrent qu'à chaque triplet correspond un adaptateur nucléotidique capable de reconnaître cette séquence et elle seule.

f) *Universalité du code.*

Nous venons de voir que des éléments d'un code ont été mis en évidence chez les microorganismes. Nous pouvons nous demander s'il est le même pour toutes les cellules. Il semble que nous devions distinguer en réalité deux problèmes.

Le premier concerne le fonctionnement du s ARN en tant qu'adaptateur nucléotidique. Nous avons vu qu'un acide aminé fixé sur du s ARN d'*Escherichia coli*, incubé dans un système extrait de réticulocytes de lapin, était incorporé dans l'hémoglobine de lapin (104). Cela tendrait à prouver que le s ARN est le même dans toutes les cellules et que le code est universel. Ce résultat étant confirmé par le fait que le poly U stimule l'incorporation de la phénylalanine dans un système extrait de cellules animales (159).

Le deuxième problème concerne le fonctionnement du s ARN en tant qu'accepteur d'acides aminés et ses rapports avec les enzymes activants. BENZER a étudié la fixation sur le s ARN de trois acides aminés dans divers systèmes et a abouti à la conclusion qu'il existait pour chaque espèce des rapports assez étroits entre s ARN et enzymes activants (160) puisque la fixation d'un acide aminé donné sur le s ARN d'une espèce ne pouvait pas se faire avec l'intervention d'enzymes activants de toutes les espèces. BERG a également montré qu'il existe chez *Escherichia coli* deux types de molécules de s ARN acceptant la méthionine en présence des enzymes activants d'*Escherichia coli* et qu'un seul des deux types moléculaires accepte la méthionine en présence des enzymes activants de la levure (161).

Nous pouvons interpréter l'ensemble de ces résultats comme montrant que le s ARN est l'adaptateur nucléotidique qui reconnaît sur la matrice le triplet spécifique de l'acide aminé. Il existerait, pour chaque triplet codant pour un acide aminé, un adaptateur nucléotidique différent; on a de bonnes raisons de penser que ce code est le même pour toutes les espèces mais le s ARN et les enzymes activants sont assez spécifiques et leurs rapports sont étroits.

C. — CONTRÔLE DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

Nous venons de voir que les gènes de l'ADN sont responsables de la structure des protéines grâce à la transcription de leur séquence nucléotidique en séquence polypeptidique. Il s'agit là de la traduction moléculaire de l'aphorisme de BEADLE

« un gène, un enzyme ». Comme des facteurs extérieurs aux cellules peuvent modifier la synthèse des protéines, on peut admettre que, si l'ADN est nécessaire, il n'est pas suffisant.

1^o) Systèmes induits et réprimés

a) *Adaptation.*

En présence de certaines substances, la cellule présente une nouvelle activité enzymatique due à la synthèse *de novo* d'un enzyme (131). Ainsi, la β -galactosidase d'*Escherichia coli* peut être formée en présence de galactosides et thiogalactosides (162) qui sont les inducteurs ; en l'absence de ces inducteurs, la synthèse de l'enzyme est mille fois plus faible. On dit qu'il y a eu induction d'un enzyme adaptatif.

b) *Inhibition.*

Le tryptophane et certains de ses analogues inhibent chez *Escherichia coli* la formation de la tryptophane-synthétase (163). Il s'agit bien d'une inhibition de la synthèse de l'enzyme et non pas de l'inhibition de son activité (qu'on appellerait rétro-inhibition). C'est le niveau interne du tryptophane qui règle la synthèse de la tryptophane-synthétase. On dit qu'il y a répression de la synthèse de l'enzyme par le tryptophane.

Nous avons là deux types de systèmes qui sont opposés. Chez l'un, l'addition de l'inducteur (lactose) équivaut chez l'autre à la suppression de l'inhibiteur (tryptophane). Ces deux phénomènes opposés sont analogues néanmoins puisque, dans les deux cas, la synthèse d'une protéine est permise ou interdite.

2^o) Constitution génétique et gène régulateur

On a pu préciser la constitution génétique de la région de l'ADN responsable de la synthèse de la galactosidase grâce à un certain nombre de mutants isolés. La synthèse de la galactosidase est commandée par le gène (*z*). Le locus voisin (*y*) commande la synthèse de la galactoside perméase ; enfin, le gène (*i*), séparé des précédents, règle le caractère adaptatif ou constitutif des deux enzymes précédents.

Par conséquent, il faut admettre que la synthèse d'une protéine est commandée par deux gènes au moins :

1. Un gène de structure (*z*) ou (*y*), qui, par sa séquence nucléotidique, commande la structure de la protéine et à qui s'applique l'affirmation de BEADLE ; une mutation de ce gène affecte la structure, donc l'activité de la protéine.

2. Un gène de régulation qui commande le taux de synthèse des protéines (en particulier le caractère adaptatif ou constitutif). Ce gène agit sur les gènes de structure par l'intermédiaire d'une substance cytoplasmique appelée « répresseur ». Le métabolite inducteur dans un cas (lactose) ou inhibiteur (appelé corépresseur) dans l'autre cas (tryptophane) agissent alors sur ce répresseur pour l'inactiver ou l'activer. On voit que la régulation est négative. La nature du répresseur n'est pas connue avec certitude pour l'instant.

3^o) Gène opérateur et opéron

Le gène régulateur émet donc un signal cytoplasmique spécifique. Quel est le récepteur de ce signal? Si l'on considère le système lactose, les deux enzymes β -galactosidase et galactoside perméase, dont les loci z et y sont contigus, sont affectés ensemble de la même façon. Dans le système de synthèse de l'histidine chez *Escherichia coli*, où interviennent 9 enzymes dont les loci sont contigus, l'histidine réprime la synthèse de tous les enzymes du groupe. Il faut donc admettre que le répresseur agit sur des unités physiologiques d'activité appelées opéron. Le répresseur se combinerait avec un élément de cet opéron de structure déterminée et empêcherait la transmission de l'information du gène au système de synthèse des protéines (c'est-à-dire, en fait, que l'ARN messenger spécifique de l'opéron ne peut plus se former). Ce locus est appelé « opérateur ». Il existe en effet des mutations qui modifient la fixation du répresseur sans modifier le fonctionnement des gènes de structure et qui doivent porter sur le locus opérateur. On a pu également montrer que le répresseur agit bien au niveau des gènes en empêchant la synthèse du messenger (64).

Cette interprétation des phénomènes d'induction et de répression chez les bactéries due à JACOB et MONOD (136) est parfaitement en accord avec les cinétiques établies (135).

III. — CONCLUSION

Nous avons donc vu quels mécanismes sont responsables de la formation des liaisons peptides dans le cas des protéines cytoplasmiques. Ils sont en accord avec l'idée que l'on se fait de la spécificité de ces protéines, en rapport avec le matériel génétique de la cellule. Mais il faut insister sur les phénomènes de régulation dans la cellule. On a pensé pendant longtemps que l'adaptation de l'équipement enzymatique des cellules ne pouvait concerner que des aspects secondaires du métabolisme. Il semble de plus en plus que tous les enzymes sont justiciables de ces mécanismes. Ils permettent à tout moment à la cellule bactérienne de faire face à des conditions de milieu. En réduisant au minimum la quantité de protéines synthétisées, ils jouent un rôle fondamental dans l'économie de la cellule.

Des faits récents montrent que dans les cellules des animaux supérieurs des phénomènes d'adaptation peuvent également être mis en évidence (165). Il faut cependant remarquer que nous nous trouvons dans une situation différente et que, à côté de l'adaptation de la synthèse des protéines au milieu, d'autres phénomènes contribuent à régler l'équipement enzymatique des cellules : pour des cellules bactériennes dont la masse double à chaque génération, des enzymes, devenus inutiles et non synthétisés, seront dilués 10 fois en un peu plus de 3 générations ; pour des cellules animales qu'on peut considérer comme des cellules stationnaires, un renouvellement constant et rapide permet d'éliminer des protéines devenues inutiles et non synthétisées. On peut néanmoins se demander si les mêmes mécanismes de régulation de la synthèse des protéines étudiés chez les microorganismes ne pourraient pas se retrouver dans les cellules animales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) HOAGLAND M. B., CHARGAFF E., DAVIDSON J. N., 1960. *The Nucleic Acids*. Academic Press, New York, **111**, 349.
- 2) ALLEN E. H., CORDES E., GLASSMANN E., SCHWEET R. S., 1960. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1068.
- 3) HOAGLAND M. B., ZAMECNIK P. C., STEPHENSON M. L., 1957. *Biochem. Biophys. Acta*, **24**, 215.
- 4) BERG P., OFENGAND E. J., 1958. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **44**, 78.
- 5) MONIER R., STEPHENSON M. L., ZAMECNIK P. C., 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **43**, 1.
- 6) KIRBY K. S., 1956. *Biochem. J.*, **64**, 405.
- 7) SMITH K. C., 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **40**, 360.
- 8) ZUBAY G., 1962. *J. Mol. Biol.*, **4**, 347.
- 9) DIRHEIMER G., WEIL J. H., EBEL J. P., 1962. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, 2312.
- 10) MANDELL J. D., HERSHEY A. D., 1960. *Anal. Biochem.*, **1**, 66.
- 11) ROSSET R., MONIER R. *Biochem. Biophys. Acta* (en cours de publication).
- 12) BROWN G. L., KOSINSKI Z., CARR C., 1961. *Coll. Int. ARN et polyphosphate*, Strasbourg, 183.
- 13) BRUNNGRABER E. F., 1962. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **7**, 199.
- 14) MONIER R., 1962. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **44**, 109.
- 15) SINGER M. F., CANTONI G. L., 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **39**, 182.
- 16) ZILLIG W., SCHACHTSCHABEL D., KRONE W., 1960. *Z. Physiol. Chem.*, **318**, 100.
- 17) ZACHAU H. G., ACS G., LIPMANN F., 1958. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **44**, 885.
- 18) PREISS J., BERG P., OFENGAND E. J., DIECKMANN F. M., 1959. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **45**, 319.
- 19) DAVIS F. E., ALLEN F. W., 1957. *J. Biol. Chem.*, **227**, 907.
- 20) BERGQUIST P. L., MATTHEWS R. E., 1959. *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 567.
- 21) DUNN D. B., 1959. *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 287.
- 22) DUNN D. B., SMITH J. D., SPAHR P. F., 1960. *J. Mol. Biol.*, **2**, 113.
- 23) SPENCER M., FULLER W., WILKINS M. H. F., BROWN G. L., 1962. *Nature*, **194**, 1014.
- 24) MONIER R., GRUNBERG-MANAGO M., 1961. *Coll. Int. ARN et polyphosphate*, 163.
- 25) Mac CULLY K. S., CANTONI G. L., 1962. *J. Mol. Biol.*, **5**, 497.
- 26) TISSIERES A., WATSON J. D., SCHLESSINGER D., HOLLINGWORTH B. R., 1959. *J. Mol. Biol.*, **1**, 221.
- 27) OTAKA E., OSAWA S., 1960. *Nature*, **185**, 921.
- 28) ALLEN E. H., GLASSMAN E., SCHWEET R. S., 1960. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1061.
- 29) TISSIERES A., 1959. *J. Mol. Biol.*, **1**, 365.
- 30) KLEE W. A., CANTONI G. L., 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**, 322.
- 31) HOAGLAND M. B., STEPHENSON M. L., SCOTT J. F., HECHT L. I., ZAMECNIK P. C., 1958. *J. Biol. Chem.*, **231**, 241.
- 32) HOLLEY R. W., MERRILL S. H., 1959. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 753.
- 33) BROWN G. L., 1960. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **10**, 208.
- 34) STEPHENSON M. L., ZAMECNIK P. C., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 1627.
- 35) Von PORTATIUS H., DOTY P., STEPHENSON M. L., 1961. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3351.
- 36) DOCTOR B. P., APGAR J., HOLLEY R. W., 1961. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1117.
- 37) HOLLEY R. W., APGAR J., MERRILL S. H., ZUBKOPF P. L., 1961. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4861.
- 38) HEIDELBERGER C., HARBERS K., LEIBMAN K. C., TAGAKI Y., POTTER V. R., 1956. *Biochem. Biophys. Acta*, **20**, 445.
- 39) CANELLAKIS E. S., HERBERT E., 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**, 170.
- 40) EDMONDS M., ABRAMS R., 1957. *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 226.
- 41) PATERSON A. R., LEPAGE G. A., 1957. *Cancer Res.*, **17**, 409.
- 42) HECHT L. I., STEPHENSON M. L., ZAMECNIK P. C., 1959. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **45**, 505.
- 43) PREISS J., DIECKMANN F. M., BERG P., 1961. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1748.
- 44) LAGERKVIST U., BERG P., DIECKMANN F. M., PLATT F. W., 1961. *Fed. Proc.*, **20**, 363.
- 45) HERBERT E., WILSON C. W., 1962. *Biochem. Biophys. Acta*, **61**, 762.
- 46) MOLDAVE K., 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **43**, 188.
- 47) LEVINTHAL C., KEYNAM A., HIGA A., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1631.
- 48) GOODMAN H. M., RICH A., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 2101.
- 49) FLEISSNEQ E., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1199.
- 50) VINCENT W. S., BALTUS E., 1960. Ine « *the Cell Nucleus* ». ed. Butterworth., p. 18.
- 51) HOLT C. E., HERBERT E., JOEL P. B., 1962 *Feb. Proc.*, **21**, 382.

- 52) LACKS S., GROS F., 1959. *J. Mol. Biol.*, **1**, 301.
- 53) ROSSET R., MONIER R., 1963. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **10**, 195.
- 54) STENT G. S., BRENNER S., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 2005.
- 55) KURLAND C. G., MAALOE O., 1962. *J. Mol. Biol.*, **4**, 193.
- 56) TISSIERES A., WATSON J. D., 1958. *Nature*, **182**, 778.
- 57) HALL B. D., DOTY P., 1958. In: *Microsomal Particles and Protein Synthesis*. Pergamon Press, Londres, 27.
- 58) PORTER K. R., 1953. *J. Exp. Med.*, **97**, 787.
- 59) PALADE G. E., PORTER K., 1954. *J. Exp. Med.*, **100**, 641.
- 60) PALADE G. E., SIEKEVITS P., 1956. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 671.
- 61) ROBERTS R. B., 1958. *Microsomal Particles and Protein Synthesis*. Pergamon Press, Londres, 8.
- 62) Mac QUILLEN K., ROBERTS R. B., BRITTEN R. J., 1959. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **45**, 1437.
- 63) WARNER J. R., KNOPF P. M., RICH A., 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **49**, 122.
- 64) GIERER A., 1963. *J. Mol. Biol.*, **6**, 148.
- 65) BELOZERSKY A. N., SPIRIN A. S., 1958. *Nature*, **182**, 111.
- 66) MIDGLEY J. E. M., 1962. *Biochem. Biophys. Acta*, **61**, 513.
- 67) YANKOFSKY S. A., SPIEGELMAN S., 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1069.
- 68) WILKINS M. H., SEEDS W. E., STOKES A. R., 1953. *Nature*, **172**, 759.
- 69) WATSON J. D., CRICK F. H., 1953. *Nature*, **171**, 737.
- 70) MARMUR J., LANE D., 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**, 453.
- 71) VOLKIN E., ASTRACHAN L., 1956. *Virology*, **2**, 149.
- 72) GROS F., HIATT H., GIBERT W., KURLAND C. G., RISEBROUGH W., WATSON J. D., 1961. *Nature*, **190**, 581.
- 73) MONIER R., 1962. *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 1001.
- 74) GROS F., HIATT H., 1961. *V^e Congrès Int. Bioch.*, Prepint n° 218.
- 75) MONIER R., NAONO S., GROS F. (en cours de publication).
- 76) HAYASHI M., SPIEGELMAN S., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 1564.
- 77) HALL B. D., SPIEGELMAN S., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 137.
- 78) SCHULMAN H. M., BONNER D. M., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 52.
- 79) BRENNER S., JACOB F., MESELSON F., 1961. *Nature*, **190**, 578.
- 80) RISEBROUGH R. W., TISSIERES A., WATSON J. D., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 430.
- 81) WEISS S. B., 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**, 1020.
- 82) HURWITZ J., BRESLER A., DIRINGER R., 1960. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **3**, 15.
- 83) RYLE A. P., SANGER F., SMITH L. F., KITAI R., 1955. *Biochem. J.*, **60**, 541.
- 84) LIPMANN F., 1941. *Adv. Enz.*, **1**, 99.
- 85) De MOSS J. A., GEMUTH S. M., NOVELLI G. D., 1956. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **42**, 325.
- 86) HOAGLAND M. B., 1955. *Biochem. Biophys. Acta*, **16**, 288.
- 87) HOAGLAND M. B., KELLER E. B., ZAMECNIK P. C., 1956. *J. Biol. Chem.*, **218**, 345.
- 88) BERG P., 1956. *J. Biol. Chem.*, **222**, 1025.
- 89) BERG P., 1956. *J. Biol. Chem.*, **222**, 991.
- 90) SCHWEET R. S., HOLLEY R. W., ALLEN E. H., 1957. *Arch. Biochem. Biophys.*, **71**, 311.
- 91) BERGMANN F. H., BERG P., DIECKMANN M., 1961. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1735.
- 92) DAVIE E. W., KONINGSBERGER V. V., LIPMANN F., 1956. *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 21.
- 93) PARDEE A. B., SHORE V. G., PRESTIDGE L. S., 1956. *Biochem. Biophys. Acta*, **21**, 406.
- 94) SHARON N., LIPMANN J., 1957. *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 219.
- 95) KALYANKAI G. D., MEISTER A. J., 1959. *J. Biol. Chem.*, **234**, 3210.
- 96) CHANTRENNE H., 1950. *J. Biol. Chem.*, **189**, 227.
- 97) KINGDON H. S., WEBSTER L. T., DAVIES E. W., 1958. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **44**, 757.
- 98) HULTIN T., 1956. *Exp. Cell. Res.*, **11**, 222.
- 99) MAGER J., LIPMANN F., 1958. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **44**, 305.
- 100) GOLDSTEIN J., HOLLEY R. W., 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **37**, 353.
- 101) WONG K. K., MOLDAVE K., 1960. *J. Biol. Chem.*, **235**, 694.
- 102) NATHANS D., LIPMANN F., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 497.
- 103) Von der DECKEN A., HULTIN T., 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **40**, 189.
- 104) Von EHRENSTEIN G., LIPMANN F., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 941.
- 105) BORSOOK H., DEASY C. L., HAAGEN-SMITH A. J., KEIGHLEY G., LOWY P. H., 1950. *J. Biol. Chem.*, **184**, 529.
- 106) HULTIN T., 1950. *Exp. Cell. Res.*, **1**, 376.

- 107) RABINOWITS M., OLSON M. E., 1956. *Exp. Cell. Res.*, **10**, 747.
- 108) CASPERSSON T., 1941. *Naturwiss.*, **29**, 33.
- 109) BRACHET J., 1942. *Arch. Biol. (Liège)*, **53**, 207.
- 110) HOAGLAND M. B., 1958. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **77**, 623.
- 111) NATHANS D., VON EHRENSTEIN G., MONRO R., LIPMANN F., 1962. *Fed. Proc.*, **21**, 127.
- 112) BISHOP J., SCHWEET R., 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, **54**, 617.
- 113) TAKANAMI M., 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, **51**, 85.
- 114) KELLER E. B., ZAMECNIK P. C., 1956. *J. Biol. Chem.*, **221**, 45.
- 115) BISHOP J., SCHWEET R., 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, **49**, 235.
- 116) DINTZIS H. M., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 247.
- 117) GOLDSTEIN A., BROWN B. J., 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, **53**, 438.
- 118) CAMPBELL P. N., GREENGARD O., KERNOT B. A., 1960. *Biochem. J.*, **74**, 107.
- 119) NIREMBERG M. N., MATTHAEI J. H., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 1588.
- 120) NATHANS D., NOTANI G., SCHWARTZ J. H., ZINDER N. D., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1424.
- 121) ARONSON A. I., BOLTON E. T., BRITTEN R. J., COWIE D. B., DUERKSEN J. D., Mc CARTHY B. J., Mc QUILLEN K., ROBERTS R. B., 1959. *Carnegie Institution, Washington, Year Book*, 229.
- 122) STROMINGER J. L., 1962. *Fed. Proc.*, **21**, 134.
- 123) LEDERBERG J., St CLAIR J., 1958. *J. Bacteriol.*, **75**, 143.
- 124) SNOCKE J. E., YANARI S., BLOCK K., 1953. *J. Biol. Chem.*, **201**, 573.
- 125) BELJANSKI M., 1961. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 1017.
- 126) WAELSCH H., 1952. *Adv. Enz.*, **13**, 289.
- 127) SUTTIE J. W., 1962. *Biochem. J.*, **84**, 382.
- 128) ANFINSEN C. B., HABER E., SELA M., WHITE F. H., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 1309.
- 129) LEVINTHAL C., SIGNER E. R., FETHEROLF K., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1230.
- 130) ANFINSEN C. B., WHITE F. N., 1961. In « *The Enzymes* », Academic Press, **5 B**, 95.
- 131) MONOD J., PAPPENHEIMER A. M., COHEN-BAZIRE G., 1952. *Biochem. Biophys. Acta*, **9**, 648.
- 132) AVERY O. T., Mc LEOD C. M., Mc CARTHY M., 1944. *J. Exp. Med.*, **79**, 137.
- 133) HERSHEY A. D., 1955. *Virol.*, **1**, 108.
- 134) EPHRUSSI-TAYLOR H., 1954. *Exp. Cell. Res.*, **6**, 94.
- 135) RILEY M., PARDEE A., JACOB F., MONOD J., 1960. *J. Mol. Biol.*, **2**, 216.
- 136) JACOB F., MONOD J., 1961. *J. Mol. Biol.*, **3**, 318.
- 137) NAONO S., GROS F., 1960. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3527.
- 138) NAONO S., GROS F., 1960. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3889.
- 139) BENZER S., 1960. *The Chemicals Basis of Heredity*. Ed. Mc Elroy W. D. et Blass B., 70.
- 140) CRICK F. H., 1957. *Biochem. Soc. Symp.*, **14**, 25.
- 141) CRICK F. H., 1958. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 138.
- 142) CRICK F. H., BARNETT F. R. S., BRENNER S., WATTS-TOBIN R. J., 1961. *Nature*, **192**, 1227.
- 143) TISSIERES A., HOPKINS J. W., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 2013.
- 144) GRUNBERG-MANAGO M., ORTIZ P. J., OCHOA S., 1955. *Science*, **122**, 907.
- 145) SPEYER J. F., LENGUEL P., BASILIO C., OCHOA S., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 63.
- 146) MATTHAEI J. H., JONES O. W., MARTIN R. G., NIREMBERG M. W., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 667.
- 147) CHARGAFF E., 1962. *Nature*, **194**, 86.
- 148) BRETSCHLER M. S., GRUNBERG-MANAGO M., 1962. *Nature*, **195**, 283.
- 149) JONES O. W., NIREMBERG M. W., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 2115.
- 150) GARDNER R. S., WAHBA A. J., BASILIO C., MILLER R. S., LENGUEL P., SPEYER J. F., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 2087.
- 151) HOAGLAND M. B., 1959. *Brookhaven Symp. In Biol.*, **12**, 40.
- 152) HOAGLAND M. B., COMLY L. T. C., 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**, 1554.
- 153) BLOEMENDAL H., LITTAUER V. Z., DANIEL V., 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, **51**, 66.
- 154) BOSCH L., BLOEMENDAL H., 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, **51**, 613.
- 155) BOSCH L., HUIZINGER F., BLOEMENDAL H., 1962. *Biochem. Biophys. Acta*, **61**, 220.
- 156) CHAPEVILLE F., LIPMANN F., VON EHRENSTEIN G., WEISBLUM B., RAY W. J., BENZER S., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1086.
- 157) NIREMBERG M. W., MATTHAEI J. H., JONES O. W., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 104.
- 158) WEISBLUM B., BENZER S., HOLLEY R. W., 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 1449.
- 159) ARNSTEIN H. R. V., COX R. A., HUNT J. A., 1962. *Nature*, **194**, 1042.
- 160) BENZER S., WEISBLUM B., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 1149.
- 161) BERG P., BERGMANN F. H., OFENGAND E. J., DIECKMANN M., 1961. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1726.
- 162) MONOD J., COHEN-BAZIRE G., COHN M., 1951. *Biochem. Biophys. Acta*, **7**, 585.
- 163) MONOD J., COHEN-BAZIRE G., 1953. *C. R. Acad. Sci.*, **236**, 530.
- 164) GROS F., BRENNER S. (résultats non publiés).
- 165) REBOUD J. P., Ben ABDELJILIL A., DESNUELLE P., 1962. *Biochem. Biophys. Acta*, **58**, 326.

MISE AU POINT

ÉTAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR LES ACIDES CÉTONIQUES DES VINS

L. DEIBNER

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

I. — INTRODUCTION

Les acides organiques du raisin et du vin ont fait et font l'objet de nombreuses études, ceci en raison de leur influence sur la qualité de ces produits.

Parmi ces acides, les acides cétoniques font figure d'exception, sans doute en raison de la faiblesse de leur quantité dans les vins. Or, à priori, les céto-acides, comme l'acide pyruvique par exemple, produit de la fermentation alcoolique, doivent jouer un rôle non négligeable dans les différentes réactions chimiques ayant lieu pendant la vinification et la conservation du vin. Par conséquent, les recherches dans ce domaine présentent un grand intérêt scientifique et pratique.

Au cours de nos travaux concernant les acides organiques des vins nous avons effectué le recensement des connaissances actuelles sur les acides cétoniques des vins. La parution toute récente d'une communication à l'Académie des Sciences, signalant la présence de ces acides dans les vins français, nous incite à avancer la publication de notre mise au point.

II. — LES ACIDES CÉTONIQUES DES VINS ACTUELLEMENT CONNUS

C'est en 1955, pour la première fois en œnochimie analytique, qu'EGOROV et BORISSOVA ont identifié et dosé les acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les vins. A vrai dire, ce travail restait peu connu en Europe malgré la parution de son analyse dans *Chemical Abstracts* (1956, 50, n° 5976) et d'après la reproduction de ses résultats dans d'autres revues soviétiques (1956-1957).

Dans ces conditions, il est bien utile, à notre avis, de donner l'essentiel du procédé utilisé par EGOROV et BORISSOVA.

Tout d'abord l'isolement des acides cétoniques s'effectue à l'aide de 2-4-dinitrophénylhydrazine. Ensuite les dinitrophénylhydrazones séparées sont identifiées au moyen de la chromatographie de partage sur papier suivant la technique de CAVALLINI et FRONTALI (1954). L'élution des taches permet le dosage spectrophotométrique des acides pyruvique et α -cétoglutarique.

Voici la description détaillée du mode opératoire utilisé. Dix millilitres de vin, mis dans un petit décanteur, sont additionnés de 1 ml de solution à 0,4 p. 100 de 2-4 dinitrophénylhydrazine dissous dans l'acide chlorhydrique 2 N (la dose du réactif doit être portée à 1,5-2 ml si la teneur en cétoacides dépasse 75 mg par litre). Après un repos de 45 minutes, les hydrazones formées sont extraites avec de l'éther sulfurique (oxyde d'éthyle) à cinq reprises avec 5 ml d'éther chaque fois. Les extraits étherés réunis sont évaporés au bain-marie, sous un vide très modéré. Le résidu est séché dans un dessiccateur sous vide, en présence d'hydroxyde de sodium, et ensuite dissous dans 3 ml de solution 2 N d'ammoniaque. La solution obtenue est lavée avec l'oxyde d'éthyle afin d'éliminer l'excès de dinitrophénylhydrazine et les hydrazones neutres. Le lavage est arrêté au moment de l'absence de coloration de l'éther additionné d'hydroxyde de sodium.

La solution ammoniacale ainsi purifiée est utilisée pour la chromatographie descendante sur papier épais, type carton.

La dose chromatographique utilisée est de 0,1 ml, le mélange de développement butanol-éthanol-eau est utilisé en proportion 40 : 10 : 50 V/V, la durée de développement est de 7-8 heures. Les hydrazones des cétoacides se présentent sous forme de taches de couleur jaune-orange. C'est ainsi qu'EGOROV et BORISSOVA ont trouvé les taches correspondantes à l'acide α -cétoglutarique, à l'acide pyruvique et à son isomère énolique dont le R_f est le plus grand des trois acides. Pour le dosage des acides on utilise la réaction colorée produite par les hydrazones en présence d'une solution normale d'hydroxyde de sodium.

Les études spectrophotométriques ont montré que les maximums d'absorption correspondent aux longueurs d'onde différentes, à savoir à 440 m μ pour l'acide pyruvique, à 420 m μ pour son isomère et à 400 m μ pour l'acide α -cétoglutarique, utilisés sous forme d'hydrazones en milieu alcalin.

Pour effectuer le dosage spectrophotométrique des cétoacides mentionnés, on découpe les portions correspondantes du chromatogramme et on les réduit en petits morceaux. Ces derniers sont mis dans les tubes d'une centrifugeuse et additionnés de 4 ml de solution normale d'hydroxyde de sodium. Au bout de dix minutes le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 3000 tours/minute. La solution décantée, de couleur rouge-brun sombre, est prête pour le dosage spectrophotométrique.

Voici les données obtenues par EGOROV et BORISSOVA pour quelques vins de différents types.

Comme on le constate, l'acide α -cétoglutarique prédomine dans les vins étudiés. Mais ce résultat ne paraît pas avoir un caractère général. En effet, MARKMANN et EL'GORT (1962) ont trouvé dans quelques vins des quantités plus élevées d'acide pyruvique, dosées au moyen de la méthode polarographique, comme le montre le tableau 2.

Sans connaître la priorité d'EGOROV et BORISSOVA et la publication de MARK-

TABLEAU I

Teneurs en acide pyruvique (son isomère compris) et en acide α -cétoglutarique

Vins	Acide pyruvique	Acide cétoglutarique
Vin type champagne doux.....	15,0	30,0
Vin type champagne sec.....	18,5	32,5
Vin type champagne demi-doux.....	18,5	32,5
Vin type champagne demi-sec.	16,5	34,0
Vin type Jerez.....	7,5	17,0
Voskevaz.....	7,5	20,0
Vin de fruit.....	23,5	36,5

TABLEAU 2

Vins	Acide pyruvique par litre	
	mM	mg
Type Porto-26, 3 ans.....	1,104	88,3
Dargom, 3 ans.....	0	0
Jerez, 5 ans.....	0	0
Bouaki, 3 ans.....	1,836	161,57

MANN et EL'GORT, BLOUIN et PEYNAUD (1963) ont trouvé dans les vins de Bordeaux les acides pyruvique et α -cétoglutarique, le premier étant prédominant (20-70 mg/litre, contre 15-40 mg/litre). Ces œnologues ont utilisé la chromatographie sur papier des 2-4 dinitrophénylhydrazones, extraites par l'acétate d'éthyle. Les hydrazones sont identifiées à l'aide de la chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 4, le solvant de développement étant le butanol saturé en ammoniacque à 4 p. 100 ou le mélange butanol-éthanol-ammoniacque 0,5 N (7 : 1 : 2). La solution 5 N d'hydroxyde de sodium est utilisée comme révélateur des taches. Également les auteurs ont eu recours à un autre procédé de dosage basé sur la destruction enzymatique des céto-acides et sur la spectrophotométrie. BLOUIN et PEYNAUD insistent également sur le pouvoir de fixation des acides pyruvique et α -cétoglutarique vis-à-vis de l'anhydride sulfureux. Or, déjà en 1958, KIELHÖFER a montré que l'activité de l'acide pyruvique ainsi que celle du diacétyle est de l'ordre de 80-78 p. 100 de celle propre à l'acétaldéhyde. Remarquons que KIELHÖFER supposait seulement la possibilité de la présence de cet acide dans les vins. En 1962, TANNER a reproduit les données de BURROUGS et WHITING (1960), concernant les pouvoirs de fixation de l'anhydride sulfureux trouvés pour les différentes substances à carbonyle présentes dans le cidre.

Comme on le sait, les travaux de WHITING et COGGINS ont permis d'identifier dans cette boisson les acides mono, di et trigalacturonique (1960 a) les acides pyruvique et α -cétoglutarique (1960 b) et la xylosone, dérivé de l'acide ascorbique (1960 c).

Nous avons reproduit dans le tableau 3, les données concernant les constantes de dissociation et le pouvoir de fixation vis-à-vis de l'anhydride sulfureux, extraites de la publication de BURROUGHS et WHITING (1960) et relatives à un certain nombre de substances identifiées dans le cidre.

TABLEAU 3

*Résultats obtenus à la température de 20°C, à pH 3-4
en présence de 50 mg d'anhydride sulfureux libre par litre*

Substances	Constante de dissociation	% de substance combinée avec SO ₂
Acétaldéhyde	$1,5 \times 10^{-6}$	100
Acide pyruvique	$4,0 \times 10^{-4}$	66
Acide α -cétoglutarique	$8,8 \times 10^{-4}$	47
L-Xylosone	$2,1 \times 10^{-3}$	27
Acide monogalacturonique	$3,0 \times 10^{-2}$	2,5
Acide trigalacturonique	$3,7 \times 10^{-2}$	2,1
Xylose	$6,9 \times 10^{-2}$	1,1
Glucose	$6,4 \times 10^{-1}$	0,12

Bien entendu, ces données, valables pour les vins, doivent être complétées par celles trouvées par KIELHÖFER (1958) pour le diacétyle, l'acétylméthylcarbinol, l'arabinose, etc. D'ailleurs, le sujet concernant les formes combinées d'anhydride sulfureux dépasse le cadre de cet article, mais nous y reviendrons à l'occasion d'un autre exposé.

III. — CONCLUSION

La présence naturelle des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les vins apparaît actuellement comme un fait établi. Comme on a pu le voir, la priorité d'identification et de dosage de ces acides revient à EGOROV et BORISSOVA (1955), tous les deux travaillant à l'Institut de Biochimie de l'Académie des Sciences de Moscou. Malheureusement les résultats de leurs recherches sont restés peu connus en Europe. En donnant un aperçu succinct des connaissances actuelles sur ce chapitre particulier de l'œnochimie analytique, la présente note a comblé cette lacune.

Reçu pour publication en juillet 1963.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLOUIN J., PEYNAUD E., 1963. Présence constante des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les moûts de raisin et les vins. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **256**, 452.
 BURROUGHS L., WHITING G., 1960. The sulphur dioxide combining power of cider. *Ann. Rep. Agr. Hort. Res. Station, Long Ashton*, 144.

- CAVALLINI D., FRONTALI N., 1954. Quantitative determination of keto-acids by paper partition chromatography. *Biochem. Biophys. Acta*, **13**, n° 3.
- EGOROV I., BORISSOVA N., 1955. Séparation et dosage des cétoacides dans le vin (titre traduit). *Doklady Akad. Nauk U. R. S. S.*, **104**, 433.
- EGOROV I., BORISSOVA N., 1956. Dosage des cétoacides dans le vin (en russe). *Vinodelie i Vinogradrastvo U. R. S. S.*, n° 2, 23.
- EGOROV I., BORISSOVA N., 1957. Séparation et dosage des cétoacides dans le vin par la méthode de la chromatographie de partage sur papier (en russe). *Biokhimiya Vinodeliya*, n° 5, 253.
- KIELHÖFER E., 1958. Die Bindung der schwefligen Säure an Weinbestandteile. *Weinberg u Keller*, **5**, 461.
- MARKMAN A., EL'GORT B., 1962. Dosage polarographique de l'acide pyruvique dans le moût en fermentation et dans les vins (en russe). *Izvestiya Vysch. Shkol. Pischev. Prom.*, n° 6, 128.
- TANNER H., 1962. Neues über die schweflige Säure und deren Bestimmung in Getränken und Konzentraten. *Schw. Z. für Obst- und Weinbau*, **71**, 222-226, 245-248, 297-300, 316-320.
- WHITINGS G., COGGINS R., 1960-a. *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 337. (d'après BURROUGHS L., WHITING G., 1960).
- WHITINGS G., COGGINS R., 1960-b. *Ibidem*, 705 (d'après BURROUGHS L., WHITING G., 1960).
- WHITINGS G., COGGINS R., 1960-c. Formation of L-Xylosone from ascorbic acid. *Nature*, **185**, 843.
-

Le Directeur-Gérant: M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 9-12-1963

Dépôt légal: 4^e trimestre 1963. N° d'impression: 1279.

ÉVOLUTION DES ACIDES MALIQUE ET LACTIQUE DANS LA VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE DE LA VENDANGE

J. CHAUVET, P. BRÉCHOT, P. DUPUY, Madeleine CROSON et R. IRRMANN

*Cuvage Chauvet Frères et Cie, La Chapelle de Guinchay (S.-et-L.),
Laboratoire des Levures, Institut Pasteur, Paris,
Station de Technologie végétale, La Sablière, Versailles (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié la disparition de l'acide malique et l'apparition de l'acide lactique dans une vendange de Beaujolais vinifiée soit par le procédé régional traditionnel, soit par le procédé de la macération carbonique. Dans ce dernier cas, les raisins présentent, après 12 jours de macération, une diminution de 25 p. 100 environ de l'acide malique sans qu'apparaisse une quantité équivalente d'acide lactique. Pendant le même temps, l'acide malique disparaît du jus par fermentation bactérienne avec production d'acide lactique. Après le pressurage, la dégradation bactérienne de l'acide malique est favorisée par cette technique de vinification.

INTRODUCTION

Les végétaux placés en atmosphère confinée ou en anaérobiose continuent à être le siège de modifications métaboliques qui en changent la composition. Le phénomène, quantitativement le plus important, découvert par BÉRARD (1821), étudié ensuite par LECHARTIER et BELLAMY (1869, 1872, 1874), MÜNTZ (1875, 1878), MAZÉ (1902) consiste dans la transformation des glucides en alcool. Dans le cas du raisin ⁽¹⁾ placé en atmosphère de gaz carbonique, PASTEUR (1872) remarque que la formation d'alcool est accompagnée de modifications organoleptiques telles que l'apparition d'une odeur vineuse, qui n'existait pas dans le fruit. A la suite de cette observation, PASTEUR se demandait si le foulage de la vendange ne pouvait pas être une pratique

⁽¹⁾ Il est bien entendu qu'il s'agit de grappes entières, intactes, dont les baies ont gardé leur intégrité cellulaire.

défavorable à la qualité du vin qui en résulte, en empêchant cette *fermentation propre* aux grains de raisins plongés dans le gaz carbonique.

Dans une étude récente, PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) ont précisé quelles étaient les modifications qui se produisent dans les raisins conservés en anaérobiose. Le sucre est transformé en alcool avec un rendement inférieur à celui de la fermentation alcoolique réalisée par la levure ⁽¹⁾. On observe en même temps la formation de produits secondaires de la fermentation : glycérol, acétaldéhyde, acide succinique, acide acétique. La dégradation des acides organiques, qui se produit pendant la maturation, persiste en anaérobiose ; le pH du jus s'élève par suite de la disparition de l'acide malique. D'après les chiffres rapportés par ces auteurs, c'est environ le tiers de l'acide malique présent qui peut disparaître au cours du séjour en anaérobiose. Enfin des modifications des membranes cellulaires se manifestent par la déméthylation partielle des pectines et par la diffusion des colorants qui passent de la pellicule dans la pulpe. CHAUVET (1954) a trouvé que ces modifications sont accompagnées d'une fermentation « aromatique » qui se traduit par un arôme et une saveur vineuse exaltée.

Il est vraisemblable qu'autrefois, lorsque l'équipement mécanique des caves était très réduit et que le foulage au pied constituait la pratique courante, une partie importante de la vendange pouvait subir la macération carbonique : les observations de PASTEUR (1872) font d'ailleurs état de grains entiers retirés de la cuve. Avec l'apparition des fouloirs mécaniques, puis celle des foulo-pompes, tous les grains furent écrasés et la macération carbonique disparut.

Reprenant les idées de PASTEUR, FLANZY (1935) appliqua le principe de la macération carbonique à un cépage du sud de la France. Le vin ainsi obtenu a été jugé comme remarquable par les dégustateurs, en outre l'acidité fixe fut plus faible que dans le vin vinifié suivant la méthode traditionnelle.

GALLAY et VUICHOD (1938) reprennent ces essais avec des cépages suisses. Ils confirment les résultats de FLANZY (1935) et constatent que le vin provenant d'un raisin hybride producteur direct est fortement amélioré par cette vinification.

D'autres expériences furent effectuées en Italie par GARINO-CANINA (1948). Bien que l'acide malique ait été déterminé par différence, cet auteur croit pouvoir en conclure qu'il disparaît au cours de la macération carbonique.

CHAUVET (1954) décrit des essais de macération carbonique effectués dans le Beaujolais. Il note, à côté de l'amélioration du bouquet, une diminution de l'acide malique. On constate d'ailleurs traditionnellement dans ce vignoble que l'absence de foulage ou le foulage partiel constitue le plus souvent un facteur de qualité.

L'extention de la méthode de macération carbonique peut être envisagée avec confiance dans d'autres régions viticoles. CHARNAY (1958) rapporte à ce sujet des résultats encourageants obtenus dans les conditions de la pratique œnologique sur des vendanges des Côtes du Rhône.

Les divers expérimentateurs sont donc d'accord pour admettre que la macération carbonique tend à diminuer l'acidité du vin, à cause de la disparition plus ou

⁽¹⁾ L'un de nous en collaboration avec A. MICHEL et R. RIVOIRE avait observé en 1957 et 1959, au cours d'essais inédits de macération carbonique de vendange, un rendement sucre/alcool de la fermentation alcoolique intracellulaire qui se montrait différent du rendement de la levure. MICHEL n'avait pas trouvé également d'acidité lactique dans le raisin ayant subi la fermentation intracellulaire malgré une disparition d'acide malique de 35 p. 100 ; il avait même observé l'hydrolyse très sensible des composés pectiques du raisin au cours d'une macération carbonique de 17 jours.

moins complète de l'acide malique (tabl. 1). Cependant d'après les expériences déjà effectuées, il n'est pas possible d'estimer la part qui provient du métabolisme intracellulaire et celle qui est due à la dégradation microbienne. Le présent travail est destiné à combler cette lacune.

TABLEAU I

Diminution de l'acidité par rapport au témoin dans diverses expériences de macération carbonique

	Acidité en méq /l		
	Témoin	Macération carbonique	Diminution (%)
FLANZY (1935)			
Acidité fixe	88-65	63	17
GALLAY et VUICHOUD (1938)			
Acidité fixe			
1 ^{re} expérience	149	117	21
2 ^e expérience	152	122	20
GARINO-CANINA (1948)			
Acidité totale.....	116	99-102	15-12
PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962)			
1 ^o Acidité totale	96	80-84	17-13
Acidité malique	50	29-34	42-32
2 ^o Acidité totale	134	98-102	27-24
Acidité malique	65	44-42	32-35

MÉTHODES ET TECHNIQUES

L'expérimentation décrite ici a été faite, au cours de la campagne 1962, sur une vendange de Beaujolais vinifiée soit par macération carbonique, soit par le procédé régional traditionnel : deux séries d'expériences ont été réalisées et sont comparables deux à deux. Les raisins avaient la même origine géographique que celle indiquée ailleurs (BRÉCHOT *et al.*, 1962), les deux modes de cuvaïson utilisés ont été décrits succinctement dans ce mémoire.

Des prélèvements ont été effectués aux différents stades de la vinification :

1) A la fin du remplissage de la cuve (cette opération durait au plus une journée) on prélève un échantillon par le robinet de « tire » ;

2) au moment du pressurage on prélève un échantillon de jus de goutte ⁽¹⁾
de jus de presse
du mélange des deux,

3) après pressurage et mise en cave.

Ces divers échantillons, décantés 24 heures au frigidaire, ont été répartis dans des ampoules de 20 ml stériles, scellées à la flamme et chauffées une demi-heure dans un stérilisateur Poupinel à 70-75°C.

⁽¹⁾ « jus de goutte » et « jus de tire » ont même signification, quoique l'expression « jus de tire » soit une désignation purement locale.

La vendange était parfaitement saine et n'a été ni sulfitée ni sucrée ; au cours de la fermentation, la température de la masse s'est élevée naturellement à 25°C, dans un cas (vinification traditionnelle n° 2) 48 heures avant le pressurage on a enregistré les températures suivantes : 29, 30, 31°C, sans que cette dernière ait été dépassée.

Les moûts avaient des densités comprises entre 1 085 et 1 090, ce qui correspond à des teneurs en sucres de 196 à 210 g/l. Les vins obtenus présentaient des richesses alcooliques variant de 11° à 12,1° GL et des acidités volatiles moyennes égales à 0,4g/l en SO⁴H². Les teneurs en sucres résiduels étaient inférieures à 2 g/l.

Les déterminations analytiques ont été les suivantes :

— l'évolution des acides malique et lactique a tout d'abord été suivie qualitativement par la technique chromatographique sur papier de RIBERAU-GAYON (1954) ;

— chacun de ces acides a été ensuite dosé quantitativement, l'acide malique par la méthode de ROSSET et DUPUY (1958), l'acide lactique par celle de DIMOTAKI-KOURAKOU (1960) ;

— sur des parties aliquotes, au moment de chaque prélèvement, on avait mesuré le pH à l'aide du pHmètre Heito (PS 18) et l'acidité totale après élimination du CO₂.

En outre, vers la fin du remplissage de chaque cuve soumise à la macération carbonique, il a été placé à la partie supérieure de la vendange un sac en polyéthylène dans lequel on avait introduit 5 kg de raisins. Dans le sac ainsi garni de raisins on a fait arriver un courant de gaz carbonique jusqu'à saturation. Cet échantillon est désigné, dans ce qui va suivre, sous le nom « lot raisins-témoins ». Un deuxième lot de raisins de même poids était pressé dès ce moment en vue de constituer l'échantillon représentatif de la vendange au moment de sa mise en cuve. L'échantillonnage se faisait en retirant 5 grappes sur le contenu de chacune des 90 bennes nécessaires au remplissage de la cuve. Ces grappes étaient étalées sur des claies et les 5 kg de raisins étaient prélevés au hasard sur cet étalement.

Enfin, dans certains cas, des examens microscopiques ont été faits :
numération de levures à la cellule de Malassez,
recherche de bactéries à l'état frais.

RÉSULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 2. Si on considère les chiffres successifs du pH et de l'acidité totale, on note des variations, qui permettent de présumer une chute de l'acidité malique plus importante dès le pressurage dans le cas de la macération carbonique.

Également avec celle-ci, le lot de raisins-témoins a permis d'enregistrer les résultats suivants : on y observe une diminution appréciable de l'acide malique, 26 à 29 p. 100 de l'acide initial, sans qu'il y ait apparition concomitante d'acide lactique, ce qui est en accord avec la constatation de PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962). Il y a là un métabolisme de l'acide malique qui est à préciser ; la voie de la dégradation aérobie totale peut être écartée *a priori*, l'O₂ dissous dans le jus de raisin n'étant pas en quantité suffisante pour assurer une telle combustion. Il est à noter que cette disparition s'est produite en absence de développement de levures et de bactéries.

Ce tableau permet également d'observer comment se différencient ces deux modes de vinification en ce qui concerne l'évolution de l'acide malique. Avec la macération carbonique, dès le pressurage, la disparition malique est très nettement supérieure dans les jus de goutte et de presse ; la vinification traditionnelle eût-elle reporté au 12^e jour le pressurage, la chute de l'acide malique n'aurait pas atteint le niveau observé avec la macération carbonique. On remarque également que dans une vinification traditionnelle les jus de goutte sont plus riches en acide malique que les jus de presse, dans une macération carbonique le phénomène est inverse.

Avec la macération carbonique, l'acide malique a disparu entre le 12^e et le 23^e jour, alors que dans le cas de la vinification traditionnelle sa disparition ne se

TABLEAU 2

Résultats analytiques

	Jus Cuve	Lot raisins témoins	Jus de goutte	Jus de presse	Mélange des deux	Après pressurage et mise en cave		
<i>Vinification traditionnelle 1</i>	1 ^{er} jour 3,2 6,37 23,5 1,5		5 ^e jour 3,35 5,5 21,7 7,6 2,25	5 ^e jour	5 ^e jour 3,3 6,2 19,5 17 2,6	10 ^e jour 3,42 6,03	19 ^e jour 5,83 15,7 33 2,35 rares bact.	73 ^e jour 12,7 45,9 6,45
pH								
acidité totale g SO ₄ H ₂ /l								
m. mol. ac. malique/l								
ac. malique disparu p. cent								
m. mol. ac. lactique/l								
bactéries								
<i>Vinification traditionnelle 2</i>	1 ^{er} jour 3,32 6,86 31,7 1,86		7 ^e jour 3,62 5,92 22,6 28,6 3,9	7 ^e jour 3,65 5,15 16,9 46,6 2,7	7 ^e jour 3,60 5,63 20,9 34 3,9	13 ^e jour 5,30 21,9 30,8 3,9 rares bact.	21 ^e jour 19,2 39,3 5,8	67 ^e jour 4,7 85 20,5
pH								
acidité totale g SO ₄ H ₂ /l								
m. mol. ac. malique/l								
ac. malique disparu p. cent								
m. mol. ac. lactique/l								
bactéries.....								
<i>Macération carbonique 1</i>	1 ^{er} jour 3,2 6,37 28,9 1,35 1,85	1 ^{er} jour 3,4 5,90 26,7 2,74 1,85	12 ^e jour 3,55 3,97 20,7 32,4 1,49 2,6 0	12 ^e jour 3,66 4,5 5,9 79,6 14,3	12 ^e jour 3,6 4,41 11,4 60,5 9,44	15 ^e jour 4,21 nombreuses bact.	23 ^e jour 3,7 87,2 18,04	69 ^e jour 3,6 87,5 20
pH								
acidité totale g SO ₄ H ₂ /l								
m. mol. ac. malique/l								
ac. malique disparu p. cent								
m. mol. ac. lactique/l								
levures 10 ⁶ /ml								
bactéries.....								
<i>Macération carbonique 2</i>	1 ^{er} jour 3,3 6,13 29,5 1,08	1 ^{er} jour 3,2 6,6 32,6 1,8 1,44	12 ^e jour 3,53 4,65 24,1 26,1 1,7 0,6 rares bact.	12 ^e jour 3,7 4,6 8,3 71,6 14,6	12 ^e jour 3,7 4,65 13,8 53 8	14 ^e jour 4,40 nombreuses bact.	22 ^e jour 4 86,2 20	68 ^e jour 3,7 87,2 20,7
pH								
acidité totale g SO ₄ H ₂ /l								
m. mol. ac. malique/l								
ac. malique disparu p. cent								
m. mol. ac. lactique/l								
levures 10 ⁶ /ml								
bactéries.....								

produit qu'entre les 21^e et 67^e jours et même dans un cas n'intervient pas entièrement.

Les résultats observés par la technique chromatographique sur papier sont en accord avec ces conclusions.

En ce qui concerne l'acide lactique, les figures 1 et 2 correspondant à chacune des cuvaisons montrent l'évolution de cet acide en fonction du temps. On a porté en

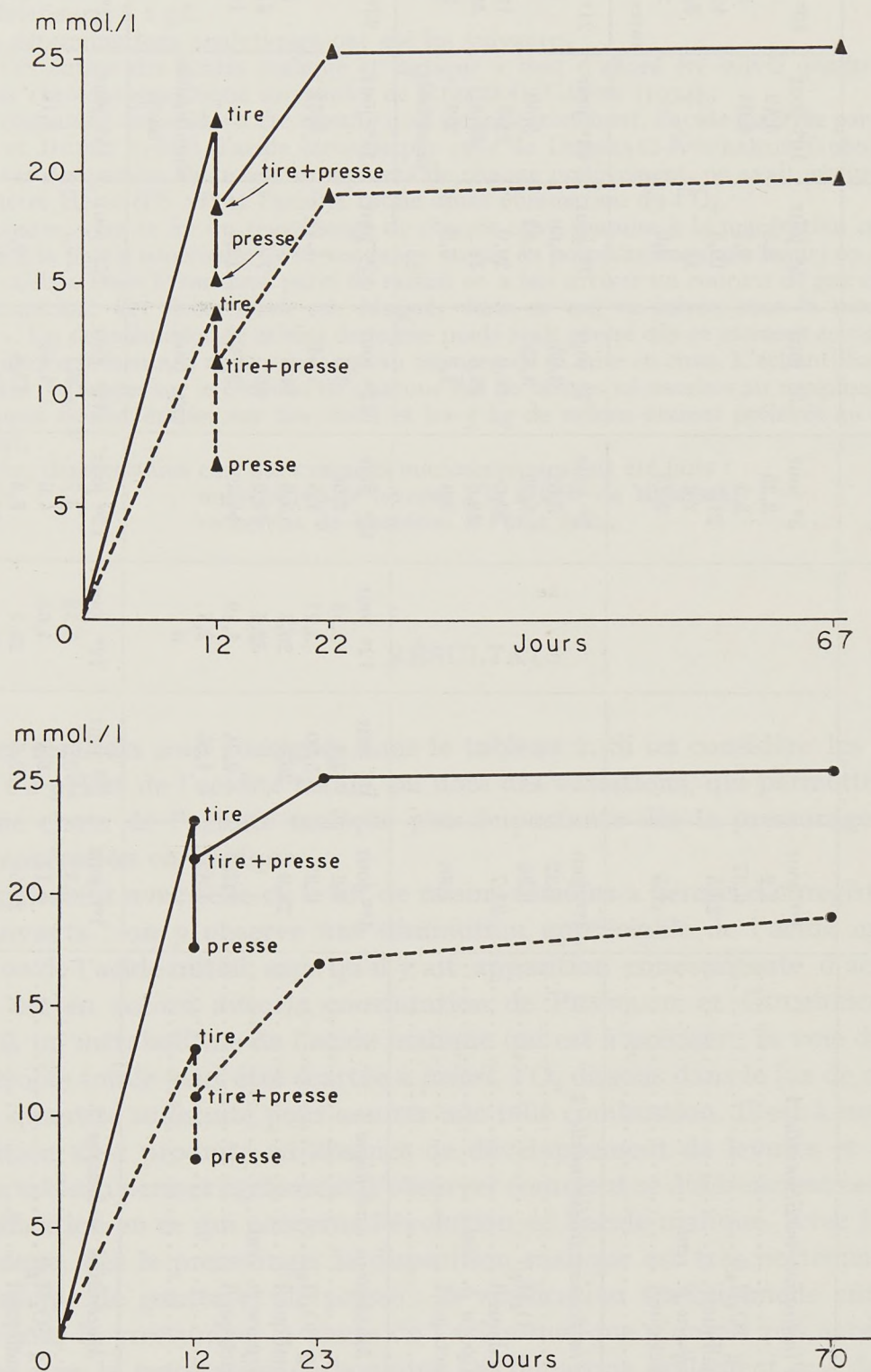


FIG. 1.

● — Macération carbonique 1
 ▲ — Macération carbonique 2
 Trait continu : ac. malique disparu
 Trait discontinu : ac. lactique apparu

abscisses les jours, en ordonnées les m. mol. d'acide lactique/l apparues ainsi que les m.mol. d'acide malique/l disparues.

Le tableau 3 a été constitué en calculant pour chacune des vinifications le rapport acide lactique apparu/acide malique disparu à chacun des instants considérés.

L'examen de ces figures et du tableau 3 permet les constatations suivantes.

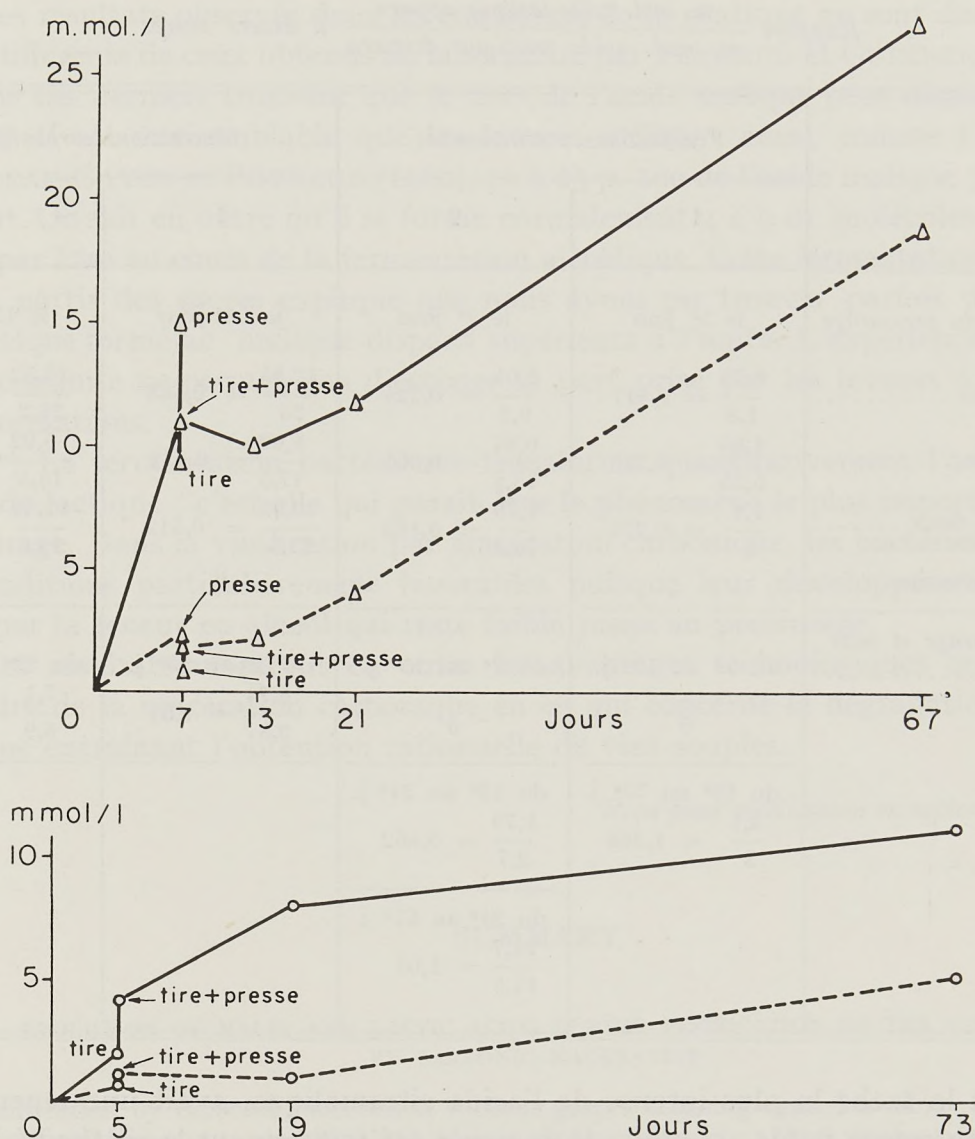


FIG. 2.

○ — Vinification traditionnelle 1
 Δ — Vinification traditionnelle 2
 Trait continu : ac. malique disparu
 Trait discontinu : ac. lactique apparu

Quel que soit le mode de cuvaision avant le pressurage, la dégradation de l'acide malique n'est pas du type malolactique. L'acide malique disparaît sans qu'apparaisse une quantité équimoléculaire d'acide lactique ; dans le lot de raisins témoins cette transformation a même eu lieu sans aucune formation d'acide lactique.

Après le pressurage la dégradation malique est du type malolactique ; avec la macération carbonique cette dégradation finale est très rapide. Le rapport acide lactique apparu/acide malique disparu est alors très voisin de 1 et peut même être supérieur.

Il a été vérifié que l'acide citramalique qui apparaît après le pressurage n'a pas faussé les déterminations de l'acide malique résiduel ; tout d'abord le vin, obtenu au cours de la vinification traditionnelle n° 2, dont le chromatogramme des acides

TABLEAU 3
Rapport $\frac{m. \text{ mol. acide lactique apparue}}{m. \text{ mol. acide malique disparue}}$ à divers temps

	Vinifications traditionnelles		Macérations carboniques	
	1	2	1	2
<i>Au moment du pressurage</i>	le 5 ^e jour	le 7 ^e jour	le 12 ^e jour	le 12 ^e jour
Jus de goutte	$\frac{0,75}{1,8} = 0,417$	$\frac{2,04}{9,1} = 0,224$	$\frac{12,95}{23} = 0,563$	$\frac{13,52}{21,2} = 0,637$
Jus de presse.....	$\frac{1,86}{5,55} = 0,336$	$\frac{0,84}{13,8} = 0,061$	$\frac{8,09}{17,5} = 0,452$	$\frac{6,92}{15,5} = 0,446$
Mélange des deux	$\frac{1,1}{4} = 0,275$	$\frac{1,79}{10,8} = 0,165$	$\frac{10,95}{21,4} = 0,512$	$\frac{11,42}{18,6} = 0,613$
Lot raisins témoins			0	0
<i>Après pressurage et mise en cave</i>	du 5 ^e au 19 ^e j.	du 7 ^e au 13 ^e j.	du 12 ^e au 23 ^e j.	du 12 ^e au 22 ^e j.
	0	0	$\frac{5,74}{3,8} = 1,51$	$\frac{7,4}{6,9} = 1,072$
	du 19 ^e au 73 ^e j.	du 13 ^e au 21 ^e j.		
	$\frac{4,1}{3} = 1,366$	$\frac{1,79}{2,7} = 0,662$		
		du 21 ^e au 67 ^e j.		
		$\frac{14,7}{14,5} = 1,01$		

présentait la tache la plus intense de l'acide citramalique, avait une teneur en cet acide relativement faible, 94 mg/l ; le dosage a été fait suivant la méthode de DIMOTAKI-KOURAKOU (1962) ; de plus *Lactobacillus arabinosus* n'a pas décarboxylé l'acide citramalique ⁽¹⁾ dans les conditions de la technique de ROSSET et DUPUY (1958).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos observations montrent que l'évolution des acides malique et lactique au cours de la vinification ne peut pas se limiter à la simple transformation de l'un en l'autre par décarboxylation. Plusieurs processus contribuent à faire évoluer la teneur de ces acides pendant cette période.

1°) L'acide malique disparaît par fermentation intracellulaire dans le grain

⁽¹⁾ Nous remercions ici M. GAVARD qui nous a fourni obligeamment un échantillon de citramalate de Na de synthèse.

de raisin sans qu'il se forme d'acide lactique. La technique de macération carbonique, parce qu'elle respecte la structure du fruit, favorise ce processus qui fait disparaître environ le quart de l'acide malique. Cette dégradation est bien le résultat d'une action intracellulaire puisque la plupart des grains sont restés intacts à l'abri de la prolifération des levures et des bactéries.

Les résultats observés dans les conditions de la pratique ne sont donc pas tellement différents de ceux obtenus au laboratoire par PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) puisque ces derniers trouvent que le tiers de l'acide malique peut disparaître ainsi.

2^o) Il est vraisemblable que les levures utilisent aussi, comme l'ont montré RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1962), 10 à 25 p. 100 de l'acide malique présent dans le moût. On sait en outre qu'il se forme normalement 4 à 9 m. molécules d'acide lactique par litre au cours de la fermentation alcoolique. Cette fermentation qui se produit à partir des sucres explique que nous ayons pu trouver parfois des rapports ac. lactique formé/ac. malique disparu supérieurs à l'unité. L'expérience telle qu'elle a été conduite ne permet pas d'estimer la part prise par les levures à ces diverses transformations.

3^o) La fermentation bactérienne transforme quantitativement l'acide malique en acide lactique : c'est elle qui paraît être le phénomène le plus important après le pressurage. Dans la vinification par macération carbonique, les bactéries bénéficient de conditions particulièrement favorables puisque leur développement n'est pas gêné par la teneur en alcool qui reste faible jusqu'au pressurage.

Ces résultats montrent en outre les avantages technologiques que l'on peut attendre de la macération carbonique en ce qui concerne la dégradation de l'acide malique entraînant l'obtention rationnelle de vins souples.

Reçu pour publication en septembre 1963.

SUMMARY

EVOLUTION OF MALIC AND LACTIC ACIDS DURING VINIFICATION OF THE VINTAGE BY CARBONIC MACERATION

Vinification by carbonic maceration without grapes crushing caused a more rapid and more clearly defined disappearance of malic acid in a vintage *Beaujolais* than vinification by the traditional regional process. The intracellular degradation of malic acid was studied by introducing bunches of grapes into a plastic bag which was placed in the tanks where the carbonic maceration took place; the disappearance of malic acid proceeded to about 25 p. 100 without the appearance of lactic acid.

At the end of carbonic maceration, lactic acid was an important constituent of the fermented juice present in the bottom of the tanks, and there were also numerous bacteria visible under the microscope.

With traditional methods of vinification, at the time of drawing off the wine from the marc, only a little part of malic acid was fermented to lactic acid by bacteria.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BÉRARD M., 1821. Sur la maturation des fruits. *Ann. Chim. Phys.*, **16**, 152-183, 225-251.
BRÉCHOT P. *et al.*, 1962. Identification des levures d'un moût de Beaujolais au cours de sa fermentation. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 235-244.
CHARNAY P., 1958. Essais de vinification. *Vignes et Vins*, n° 69, 2-8.

- CHAUVET J., 1954. Vinification en rouge par macération carbonique de la vendange. *Vignes et Vins*, n° 35.
- DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1960. Dosage de l'acide lactique dans les vins à l'aide des échangeurs d'ions. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **53**, 569-580.
- DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1962. Présence de l'acide α -méthylmalique dans les vins. *Ibid.*, **55**, 149-158.
- FLANZY M., 1935. Nouvelle méthode de vinification. *C. R. Acad. agric.*, **21**, 935-938. Sur la vinification des vins rouges. Nouvelle méthode de vinification. *Rev. Vitic.* **83**, 315-319, 325-329, 341-347.
- GALLAY R., VUICHOUD A., 1938. Premiers essais de vinification en rouge d'après la méthode FLANZY. *Rev. Vitic.*, **88**, 238-242.
- GARINO-CANINA E., 1948. Fermentation vinaire avec des détails biochimiques du processus de la fermentation du moût de raisin. *Bull. Off. inter. Vin.*, **21**, 55-61.
- LECHARTIER G., BELLAMY F., 1869. Étude sur les gaz produits par les fruits. *C. R. Acad. Sci.*, **69**, 356-360.
- LECHARTIER G., 1872. De la fermentation des fruits. *Ibid.*, **75**, 1203-1206.
- LECHARTIER G., 1874. De la fermentation des pommes et des poires. *Ibid.*, **79**, 949-952, 1006-1009.
- MAZE P., 1902. Recherches sur les modes d'utilisation des aliments ternaires par les végétaux et par les microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, **16**, 195-232.
- MÜNTZ A., 1875. Recherches sur les fonctions des champignons. *C. R. Acad. Sci.*, **80**, 178-181.
- MÜNTZ A., 1878. Recherche sur la fermentation alcoolique intracellulaire. *Ibid.*, **86**, 49-52.
- PASTEUR L., 1872. Faits nouveaux pour servir à la connaissance de la théorie des fermentations proprement dites. *C. R. Acad. Sci.*, **75**, 784-791.
- PASTEUR L., 1872. Note sur la production de l'alcool par les fruits. *Ibid.*, **75**, 1054-1056. in *Traité d'Œnologie*, I, RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., p. 522, librairie Polytechnique Ch. BÉRANGER, Paris, 1960.
- PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 161-167.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Évaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. *Ann. Fals. Fraud.*, **47**, 3-9.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1962. Application à la vinification de levures métabolisant l'acide malique. *C. R. Acad. Agric.*, **48**, 558-560.
- ROSSET R., DUPUY P., 1958. Détermination de l'acide l-malique dans les boissons fermentées par décarboxylation enzymatique. *Ann. Technol. agric.*, 441-451.

ÉTUDE DES FACTEURS LIMITANT LA CROISSANCE DES LEVURES DANS LES MOÛTS DE « CLAIRETTE » ET DE « MUSCAT BLANC A PETITS GRAINS »

C. BIZEAU

avec la collaboration technique d'Émilienne BIZEAU

*Station de Technologie agricole,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, Montpellier (Hérault)*

SOMMAIRE

Dans le cadre d'une étude des procédés de fabrication des vins mousseux, type *Clairette de Die*, les auteurs ont effectué une étude systématique des facteurs, autres que les sucres, limitant la croissance des levures dans les moûts.

L'importance de chaque facteur limitant est mise en évidence par le calcul du rendement de croissance obtenu lorsqu'il agit seul dans les moûts étudiés.

I. — INTRODUCTION

Les moyens traditionnels d'obtention de mousseux par la « méthode rurale », ainsi que la fabrication de vins naturellement doux, mettent en jeu des phénomènes de stabilisation biologique.

Avec DEIBNER (1953), nous appellerons « stabilité biologique » du vin, la propriété de ce dernier de résister à l'action des microorganismes et des levures. Dans ce qui va suivre, nous ne nous occuperons que de la stabilité vis-à-vis des levures.

La « méthode rurale » consiste à obtenir un vin mousseux par refermentation en bouteille d'un « mi-fermenté » contenant encore du sucre. Cette refermentation ne doit pas être trop forte. Il ne faut pas que la pression du gaz carbonique risque de faire casser les bouteilles. Il faut conserver au vin un peu de sucre. Ceci est vrai surtout dans le cas de la *Clairette de Die* dont le parfum musqué demande à être accompagné d'une certaine douceur.

La première phase de la fabrication sera donc l'obtention d'un vin doux pouvant subir une refermentation limitée. Si, au lieu d'un mousseux, on veut obtenir un vin naturellement doux, il faut qu'une fermentation ne puisse plus du tout se produire. Il faut donc pousser plus loin que dans le 1^{er} cas la stabilisation de ces vins vis-à-vis des levures. Pour réaliser ceci, on peut d'abord compter sur une teneur en sucre élevée du moût servant de matière première.

DELLE (1908) et KOTCHERGA (1940) ont établi expérimentalement une règle permettant de calculer la stabilité d'un vin doux d'après sa composition. OCHRE-MENKO (1947-1948) a étendu ce calcul au cas des mousseux en tenant compte de la pression du gaz carbonique dans les bouteilles.

Parmi les facteurs de cette stabilité, étudiés par ces auteurs, citons : l'alcool, le sucre lui-même et les produits secondaires de la fermentation alcoolique (SCHOU-MAKOV (1934).

A la suite des travaux de NILOV (1962), il faudrait y ajouter certains constituants du parfum du raisin.

La règle de DELLE permet de juger la stabilité d'un produit fini, ou la possibilité pour un mi-fermenté de donner une mousse suffisante sans bris de bouteilles. Mais on ne dispose pas toujours d'une matière première dont la richesse saccharine est telle qu'elle permette d'atteindre la stabilité par le jeu des facteurs pris en considération par les auteurs cités.

Dans le cas des vins doux, si l'on part de moûts insuffisamment riches en sucre et susceptibles de fermenter complètement, il faut provoquer artificiellement l'arrêt de fermentation et de plus, obtenir un milieu tel qu'il soit très difficile aux levures de s'y développer à nouveau. Dans le cas des vins mousseux il faut pouvoir limiter la fermentation secondaire, même si la matière première ne permet pas d'atteindre la teneur en sucre et en alcool et la pression de gaz carbonique nécessaires à la stabilité.

On fait alors appel à des méthodes de vinification ayant pour but d'appauvrir le vin en substances autres que le sucre, nécessaires à la multiplication des levures.

On trouvera la description de ces pratiques dans les travaux de ROOS et ROLLAND (1903) sur la *Clairette de Die*, de GUILHEM (1950) sur la *Blanquette de Limoux*, et dans l'ouvrage d'œnologie de CAZALIS (1900).

Leur principe est le suivant : il s'agit par des soutirages successifs ou des filtrations, ou l'utilisation de la pratique ancestrale du « guillage », de provoquer la formation de générations successives de levures de façon à ce que le milieu s'appauvrisse très vite en éléments nutritifs indispensables aux levures, et cela sans que beaucoup de sucre soit consommé. On peut ainsi ralentir la fermentation, et même l'arrêter avant son terme normal (NÈGRE, 1951-1958) mais on conçoit combien il peut être difficile de se rendre maître de tels phénomènes.

Les caves qui mettent en pratique la « Méthode rurale » pour la fabrication de mousseux, utilisent actuellement des filtrations répétées pour augmenter la stabilité biologique de leurs mi-fermentés. L'emploi du froid permet d'arrêter à volonté les départs en fermentation ; d'autre part, après la prise de mousse, il est fait une filtration isobariométrique de bouteille à bouteille qui permet de renforcer, si besoin est, l'action de la stabilisation biologique, tout en éliminant les dépôts de levures nuisibles à la présentation du produit.

Ces techniques sont satisfaisantes puisqu'elles assurent une bonne régularité

au travail de la cave sans changer la méthode dans son principe. Cependant, elles demeurent encore empiriques. Pour bien les diriger il faudrait connaître le rôle et le sort de chaque constituant du moût au cours de cette fabrication, et doser les plus importants d'entre eux.

A défaut, on peut espérer contrôler le nombre de filtrations, si l'on dispose d'un test permettant de déterminer la fermentescibilité obtenue après chaque filtration : c'est à ces deux préoccupations que tente de répondre ce travail.

Il a été entrepris dans le but :

1) de rechercher quels constituants du moût peuvent jouer le rôle de facteurs limitant la croissance des levures dans les vins spontanément mousseux et les vins naturellement doux.

2) de trouver un indice de « fermentescibilité » permettant de reconnaître les mi-fermentés devenus suffisamment stables pour assurer une bonne prise de mousse et par conséquent permettant de savoir quand arrêter les filtrations.

Notre étude a porté sur des moûts de « *Clairette* » et de « *Muscat blanc à petits grains* » qui sont utilisés pour obtenir de tels vins.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1) un clone de *Saccharomyces cerevisiae* souche « B » (GALZY — 1959)

2) moûts de *Clairette* et de *Muscat blanc à petits grains*.

La *Clairette* est un cépage blanc à grappes moyennes, peu serrées — maturité 3^e époque.

Elle donne un vin alcoolique qui madérise rapidement.

Le *Muscat blanc à petits grains* ou *Muscat de Frontignan* est un cépage précoce (2^e époque) à grappes moyennes, compactes, à saveur musquée caractéristique.

Il en existe un type noir cultivé en impureté dans le muscat blanc au moins dans la Drôme (GALET, 1958.)

Les deux cépages ont pour caractéristiques de donner des moûts très riches en sucre à maturité ; mais, alors que le moût de muscat est gras, colmate les filtres, la clairette — comme son nom l'indique — donne un jus clair, facile à filtrer.

Le muscat de *Frontignan* a aussi la réputation chez les praticiens de fermenter moins bien que la clairette.

B. — MÉTHODES ANALYTIQUES

Nous avons cherché à connaître partiellement la composition des matières azotées des moûts étudiés. Ont été dosés ainsi l'azote total, l'azote aminé, l'azote ammoniacal. Par ailleurs, les acides aminés libres, présents dans les moûts, ont été reconnus individuellement par chromatographie sur papier, mais non dosés.

1. Azote total

Méthode Kjeldahl. Les échantillons à doser sont d'abord évaporés à feu doux en présence de 1 ml de SO_4H_2 10 p. 100. Lorsqu'il ne reste plus que 5 ml de liquide environ, on ajoute 15 ml d'acide sulfurique RP et 1 g de mélange de Pregl (Selenium, SO_4Cu , SO_4K_2) et on porte à feu vif.

Après minéralisation, on distille dans un appareil de Parnas et Wagner. L'ammoniaque est recueilli dans l'acide sulfurique N/10 — N/50 ou N/100 et dosé en retour par la soude.

2) *Azote ammoniacal*

Selon V. DIMOTAKI KOURAKOU (1960)

3) *Azote aminé*

L'azote aminé a été dosé par la méthode *Sørensen*. On sait que cette méthode donne des résultats par défaut pour les moûts et les vins, en particulier parce qu'elle ne permet pas de doser complètement la proline.

D'autre part, par formol-titration, on dose non seulement les radicaux aminés des acides aminés libres, mais également les radicaux aminés libres des peptides. Il n'est donc pas possible de connaître par cette méthode la teneur réelle du moût en acides aminés libres. On peut, par purification sur une résine échangeuse de cations (Dowex 50), purifier les acides aminés du moût en éliminant les corps qui gênent la formol-titration, sucres en particulier, mais dans le milieu ainsi purifié il reste des di- et tripeptides (SAMUELSON, 1952) qui sont, nous le verrons, en quantités importantes.

Finalement nous opérons de la façon suivante :

50 ml de moût sont pipetés quantitativement sur une colonne de 10 ml de Dowex 50, forme H^+ (Cette résine doit avoir subi plusieurs cycles de régénération). On rince la colonne avec 250 ml d'eau déminéralisée puis on élue par l'ammoniaque N. On jette les 10 premiers ml de filtrat et on recueille les 100 ml suivants. Sur 40 ml de cet éluat on dose, après évaporation sous vide à température ambiante, la somme des acidités dues aux acides aminés libres et aux peptides selon la méthode de WILSTATTER et WALDSCHMITT LEITZ (1921). Pour ce faire, le résidu sec est dissous dans 2 ml d'eau, on ajoute 100 ml d'alcool absolu et on titre par la potasse N/20 dans l'alcool à 96° (indicateur de virage : la thymol phtaléine).

Sur les 40 autres ml, on titre l'acidité des peptides et de 28 p. 100 des acides aminés dans l'alcool à 50°, par la potasse alcoolique N/20, la phénolphtaléine étant l'indicateur de fin de titrage.

Soit n_{cc} de potasse alcoolique utilisés dans le premier cas, n'_{cc} dans le second.

Azote aminé des acides aminés libres = $48,5 (n - n')$ mg d'N aminé / litre de moût.

Azote aminé des peptides = $35 n - 48,5 (n - n')$ mg d'N aminé libre par litre.

La méthode WILLSTATTER ne permet pas de doser l'arginine. Celle-ci a été dosée séparément par colorimétrie selon MAC PHERSON (1946) après que les échantillons aient subi une purification sur Dowex 50.

Nous donnerons donc, pour les moûts étudiés, l'azote aminé libre dosé par la méthode SORENSSEN, l'azote aminé des acides aminés libres dosé par la méthode à l'alcool et corrigé d'après les résultats du dosage de l'arginine, l'azote aminé libre des di- et tripeptides et la teneur en arginine.

4. *Chromatographie des acides aminés*

Chromatographie bi-dimensionnelle sur papier selon la méthode utilisée pour les vins par P. BIDAN et L. ANDRÉ (1958).

Rappelons qu'elle comporte :

- a) une purification sur Dowex 50 (voir plus haut) ;
- b) des reconnaissances sur un chromatogramme en une dimension dans le butanol acétique, par différentes réactions colorées :
 - PAULY : histidine — GERNGROSS : tyrosine ;
 - WINEGARD et TOENIES : acides aminés soufrés ;
 - SAKAGUCHI : arginine — ERLICH : tryptophane ;
- c) un ou plusieurs chromatogrammes en deux dimensions sur papier tamponné :
 - 1^{re} dimension : phénol tamponné au même pH que le papier,
 - 2^e dimension : butanol, acide acétique, eau (4, 1, 1).

Pour la 1^{re} dimension nous avons choisi en général le tampon pH 4,4 qui permet de séparer convenablement les acides aminés du moût.

Pour quelques chromatogrammes, on a utilisé aussi le tampon pH 11,2 pour lequel les acides aminés basiques sont mieux séparés.

d) La révélation est faite par la nihydrine à 0,5 p. 100 dans le butanol saturé d'eau et additionné de 2 p. 100 de collidine. Certains acides aminés donnent alors une tache de couleur différente (ex : rouge pour le glycocole, vert bleu pour l'acide aspartique) et servent de marqueurs.

Dans ces conditions, la plupart des acides aminés sont bien séparés, cependant on ne sépare pas la méthionine de la valine, ni la leucine de l'isoleucine.

On peut faire un deuxième chromatogramme après hydrolyse chlorhydrique du résidu sec d'acides aminés purifié par passage sur Dowex 50, ce qui permet d'avoir une idée de la composition en acides aminés des petits polypeptides du moût.

On trouvera la bibliographie de ces méthodes dans l'article de P. BIDAN et L. ANDRÉ cité précédemment.

C. — MESURE DU RENDEMENT DE CROISSANCE SUR UN MOÛT

La fermentescibilité d'un moût vis-à-vis d'une souche de levure est une notion peu précise ; ce que nous cherchons en fait, c'est à mettre en évidence les facteurs autres que le glucose limitant le développement des levures dans les moûts.

En réalisant une série de dilutions d'un même moût dans une solution et en évaluant la récolte de levures obtenue pour chaque dilution au moment où la croissance maximum a été atteinte, on peut tracer une courbe des populations obtenues en fonction de la quantité de moût ajoutée à la solution de glucose ; dans ces conditions, ce n'est pas le glucose le facteur limitant. Si le facteur limitant est une substance nutritive pour la levure, on obtiendra une droite dont la pente dans le système de coordonnées choisi, sera proportionnelle à la quantité de cette substance présente dans le moût. Nous tâcherons donc de nous placer dans des conditions telles qu'il n'y ait qu'un facteur limitant.

Le tableau 1 donne la composition des milieux utilisés.

TABLEAU I

Composition des milieux utilisés pour la mesure du rendement de croissance

Milieu	a	b	c	d ⁽¹⁾	e	f
Quantité de solution de glucose à 5 %	10 ml	9,9 ml	9,8 ml	9,7 ml	9,5 ml	9 ml
Quantité de moût	0	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,5 ml	1 ml
Quantité de milieu	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

⁽¹⁾ Remarque : Le milieu d n'a été utilisé que pour certains moûts de muscat.

Les milieux sont pipetés stérilement dans des erlenmeyers de 100 ml.

Ceux-ci et la solution de glucose sont stérilisés à l'autoclave à 120°, 20 minutes. Les moûts sont stérilisés par filtration sur filtres Carlson.

Il est bon, lors de la filtration stérilisante des moûts, de jeter les 10 premiers ml qui traversent le filtre, celui-ci retenant une certaine quantité de substances extractives par adsorption.

Ceci est surtout nécessaire lorsqu'on veut doser l'azote assimilé, la perte occasionnée par la filtration variant de 0,6 à 1,5 mg d'azote pour 100 ml de moût.

Les erlenmeyers ainsi préparés sontensemencés avec 0,1 ml d'une culture de souche B.

Afin que l'ensemencement n'apporte ni azote ni facteurs biotiques, la culture, qui est faite sur milieu liquide : yeast extract 0,5 p. 100 — glucose 0,5 p. 100, est centrifugée, lavée plusieurs fois dans l'eau distillée stérile et mise en suspension dans l'eau distillée stérile. On ensemence avec 0,1 ml de suspension qui contiennent de 40 000 à 140 000 cellules.

Au bout de 3 à 4 jours à l'étuve à 25°, la croissance est terminée. On compte le nombre de cellules présentes par ml de milieu à l'aide d'un hématimètre Thoma.

On agite les milieux deux fois par jour pendant la croissance afin de régulariser celle-ci et d'éviter la présence d'un trop grand nombre d'amas de cellules lors des numérations.

Sur un graphique on porte en abscisse la proportion de moût dans les milieux, en ordonnée la croissance obtenue en millions de cellules par ml. Lorsque la croissance est proportionnelle à la quantité de moût utilisée, la pente de la droite constitue une mesure exacte du rendement de la croissance sur le moût étudié.

D. — CALCUL DU RENDEMENT DE CROISSANCE

On peut calculer rigoureusement le rendement de croissance en calculant l'équation de la droite de régression de y en x .

1°) Exemple

En fin de croissance on a obtenu pour un moût les résultats suivants :

x = teneur du milieu en moût
(ml de moût dans 10 ml de milieu) } 0 — 0,1 — 0,2 — 0,5 — 1

y = population obtenue
en millions de cellules/ml } 0,4 — 8,1 — 21,3 — 37,3 — 87

0,4 — 10,4 — 15,7 — 36,2 — 59

On retrouvera ces résultats exprimés graphiquement sur le graphique n° 1.

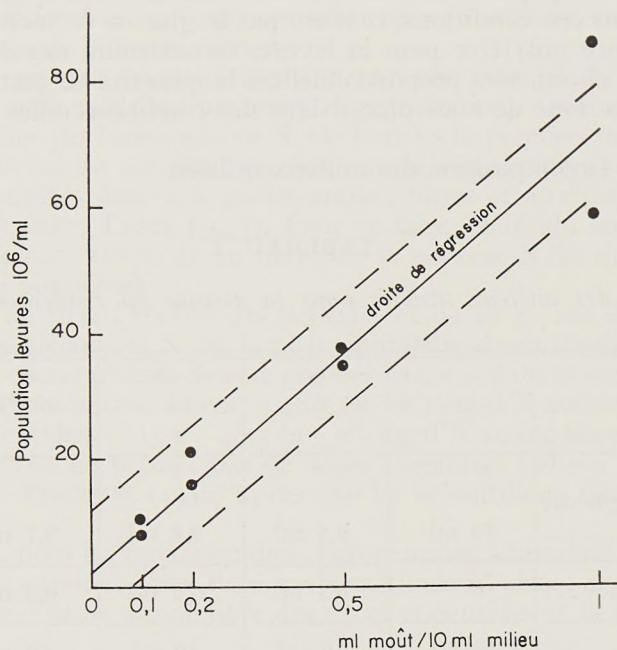


FIG. 1.

L'équation de la droite de régression s'écrit :

$y' = a + b(x - \bar{x})$ et on a :

$$a = \bar{y} \quad \text{et} \quad b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{N}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}} \quad (\text{GALZY, 1958}).$$

Le calcul ci-dessus donne pour le moût considéré $y' = 70,8x + 2$

La précision de cette mesure est donnée par le calcul des variances de a et de b :
ici $Sa = 1,7$ $Sb = 4,7$.

On peut connaître la probabilité de la régression en calculant : $t = \frac{Sb}{b}$

ici $t = 15$. Or les tables donnent pour $n = 8$ et $P = 0,01$, $t = \sqrt{11,26}$. La régression est donc hautement significative.

2°) Signification des paramètres de la droite de régression

$a - b\bar{x} = 2$ est la valeur de y' pour $x = 0$, il représente la population de levures apportée par l'ensemencement plus la croissance que peut donner cette population sur le glucose pur.

$(a - b\bar{x})$ est toujours petit, soumis à une variance importante. Sa mesure est sans intérêt et nous ne nous en occuperons plus dans ce qui va suivre.

b est la pente de la droite de régression. Elle est proportionnelle à la concentration dans le moût du ou des facteurs limitants recherchés.

Pour $x = 1$, b est égal à la population de cellules présente dans 1 ml de milieu.

Pour $x = 1$, 10 ml de milieu contiennent 1 ml de moût; $10 \times b$ exprime donc le rendement de croissance du moût en millions de cellules par ml.

Si l'on tient compte de l'ensemencement, la valeur rigoureuse de ce rendement de croissance est : $10 [b - (a - b\bar{x})]$

3°) Comparaison de deux rendements de croissance

On peut savoir si deux moûts ont des rendements de croissance significativement différents, en calculant :

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S(b_1 - b_2)}$$

Exemple : le moût de *Clairette de Die* récolté le 20 septembre a donné $b = 56,6$ et $Sb = 4$. Pour la comparaison de ce moût avec le précédent, nous calculons :

$$t = \frac{70,8 - 56,6}{\sqrt{38}} = 2,3.$$

La comparaison avec la table de t donne pour $N_1 + N_2 - 4 = 16$ et $t = 2,3$, une probabilité comprise entre 0,05 et 0,02, c'est à dire qu'il n'y a que 2 à 5 chances sur 100 que la différence observée soit due au hasard.

Les rendements de croissance de ces deux moûts sont donc significativement différents.

4°) Précision des résultats

Les deux moûts pour lesquels nous avons calculé b dans les paragraphes précédents, ont donné un rendement de croissance très élevé et la précision de la mesure de b en a souffert. En effet, l'erreur sur les résultats des comptages augmente lorsque la population obtenue devient trop importante. Cependant le tableau n° 2 qui donne les résultats d'une expérience effectuée sur un moût de clairette montre que cette erreur est d'environ 10 p. 100 tant qu'on ne dépasse pas une population de 60 millions de cellules par ml de milieu.

TABLÉAU 2

Précision des comptages

Teneur du milieu en moût	0 %	1 %	2 %	5 %	10 %
Population obtenue (moyenne de 10 échantillons)	0,3	6,8	13,4	32,5	61
Écart type	0,1	1,1	1,1	4,4	6,9

Pour l'étude des milieux donnant une forte croissance il sera préférable de ne pas préparer de milieux contenant plus de 5 p. 100 de moût. Ce sera le cas en particulier lorsque nous utiliserons des milieux plus complexes contenant par exemple, outre le moût et le glucose, de l'azote ammoniacal, des sels minéraux, etc.

Dans les autres expériences nous utiliserons les milieux décrits par le tableau 1 en faisant deux cultures sur chacun d'eux et plusieurs comptages sur le même flacon. Une erreur peut être apportée par l'évaporation du milieu de culture pendant la croissance. Cette évaporation a été mesurée pendant nos expériences. Elle est en moyenne de 2 p. 100 au bout de 6 jours et de 30 p. 100 au bout de 10 jours. On la négligera dans l'expression des résultats si les comptages ont été effectués au bout de 2 à 3 jours.

E. — DÉTERMINATION DE L'AZOTE ASSIMILÉ

Les expériences décrites précédemment mettent en jeu de très petites quantités de moût ce qui ne permet pas le dosage de l'azote consommé directement dans chaque échantillon de façon suffisamment précise.

Pour le dosage de l'azote consommé nous avons opéré sur 100 ml de dilution de moût dans du glucose.

La croissance est obtenue en erlenmeyer de 1l, à 25°, comme précédemment. On prépare quatre échantillons : deux contiennent des milieux à 5 p. 100 de moût, deux des milieux à 10 p. 100.

Au bout de 3 à 4 jours, on prélève une goutte de culture et on vérifie au microscope que la croissance est terminée (absence de bourgeonnement, comparaison de la population obtenue avec celle des petits échantillons utilisés pour la mesure de la fermentescibilité).

La culture est ensuite filtrée sur membrane stérilisante « millipore » Haw PO 2500. Il faut changer quatre ou cinq fois de membrane durant la filtration car les membranes se colmatent très vite. La filtration terminée, on rassemble la totalité du filtrat et on porte à 200 ml dans un ballon jaugé.

La détermination de l'azote total restant dans le milieu, après la croissance, est effectuée comme il a été décrit dans les méthodes analytiques, sur 100 ml de filtrat. On peut ainsi faire en double la détermination de l'azote résiduel dans chaque échantillon.

Par différence avec l'azote total du moût, on a l'azote consommé par les levures. Il n'a pas été possible de doser en même temps l'azote présent dans les levures retenues sur les membranes; celles-ci apportent trop d'azote et en quantité trop variable lorsque l'on veut minéraliser ensemble la membrane et les levures qu'elle porte.

F. — RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DES FACTEURS LIMITANT LA CROISSANCE

1^o) Milieux utilisés

Dans des conditions expérimentales telles que ce soit un facteur alimentaire qui soit le facteur limitant la croissance des levures et lorsque le sucre ne peut jouer ce rôle, on peut l'attribuer à l'azote, aux sels minéraux ou aux vitamines.

TABLEAU 3

Composition des milieux utilisés pour l'étude des facteurs limitants

N° du milieu	I	II	III	IV	V	VI	VII
Glucose + moût....	8 ml	9 ml	8 ml	9 ml	9 ml	10 ml	10 ml
Sels minéraux.....	1 ml	1 ml	1 ml	—	—	—	—
Vitamines	0,1 ml	0,1 ml	—	0,1 ml	—	0,1 ml	—
Azote.....	1 ml	—	1 ml	1 ml	1 ml	—	—
Quantité de milieu ..	10,1 ml	10,1 ml	10 ml	10,1 ml	10 ml	10,1 ml	10 ml
Facteur limitant à mettre en évidence	—	Azote	Vitamines	Sels minéraux	Vitamines et sels minéraux	Azote et sels minéraux	Témoin (mesure de b)

Pour rechercher le rôle de chacun de ces trois groupes de composés nous avons préparé des milieux tels que seul l'un d'eux soit apporté par le moût.

Le tableau 3 donne la composition des milieux utilisés et le facteur limitant qu'ils sont destinés à mettre en évidence. Pour chacun de ces milieux, on préparait deux fois 5 échantillons ayant des teneurs en moût respectivement de 0 - 1 - 2 - 4 et 5 p. 100. On peut ainsi, par mesure de la

population de levures obtenue sur chaque milieu, vérifier que la croissance reste proportionnelle à la quantité de moût ajoutée, et calculer b' , rendement de croissance du moût pour le facteur limitant étudié.

2) Solutions utilisées pour la constitution des milieux

a) Solution de vitamines :

Panthoténate de calcium	: 80 mg	Biotine	: 0.8 mg
Thiamine hydrochlorure	: 80 mg	Inositol	: 80 mg
Pyridoxine	: 80 mg		
Acide nicotinique	: 200 mg		
pour 200 ml de solution			

b) Solution de sels minéraux :

Acide citrique	: 1,0 g
Sulfate de magnésium	: 0,7 g
Phosphate monopotassique	: 1,0 g
Chlorure de sodium	: 0.5 g
Chlorure de calcium	: 0,4 g
Chlorure ferrique	: 0.01 g
Pour 1 litre de solution.	

c) Sources d'azote :

Solution de glycocole à 17,2 g/l correspondant à 3,2 g d'azote par litre.

Solution de phosphate monoammonique à 9,2 g/l contenant 1,1 g d'azote par litre.

Solution de phosphate monoammonique à 6 g/l et de sulfate d'ammoniaque à 2 g/l contenant 0,93 g d'azote/litre.

Solution de sulfate d'ammoniaque à 5,4 g/l contenant 1,2 g d'azote/litre.

Toutes ces solutions sont stérilisées par autoclavage 20 minutes à 120°, sauf la solution de vitamines qui est préparée par filtration stérilisante sur filtre Carlson.

III. — ÉTUDE DE LA CLAIRETTE

A. — ÉTUDE DU RENDEMENT DE CROISSANCE

Le tableau 4 donne les résultats du calcul du rendement de croissance pour 7 échantillons de *Clairette* récoltés en 1961 et en 1962.

TABLEAU 4

Rendements de croissance des moûts de Clairette

N° des échantillons	1	2	3	4	5	6	7
b	7,4	66,1	18,8	56,6	76,0	39,8	20,9
S b	0,6	3,7	2,6	3,9	6,8	2,9	1,7

Ce rendement varie de 70 à 700 millions de cellules par ml de moût.

Le tableau 5 permet de comparer entre eux ces résultats. La plupart du temps les différences obtenues sont significatives.

Il y a donc de très grosses différences dans la valeur nutritive des moûts d'un même cépage pour les levures.

TABEAU 5

Probabilités des différences obtenues entre les rendements de croissance des divers moûts de Clairette

N° des échantillons	1	2	3	4	5	6
7	0,5	< 0,01	0,5	< 0,01	< 0,01	< 0,01
6	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,1	< 0,01	
5	< 0,01	0,2	< 0,01	0,02		
4	< 0,01	0,05	< 0,01			
3	< 0,01	< 0,01				
2	< 0,01					

B) ÉTUDE DES FACTEURS LIMITANT LA CROISSANCE

Sur un moût pris comme exemple nous donnerons le résultat de l'étude des facteurs limitant la croissance.

1) Croissance sur milieu I

On trouvera sur le graphique 2 la courbe du rendement de croissance obtenue avec les milieux I contenant du glucose, des sels minéraux, des vitamines, du gly-cocole et des doses croissantes de moût.

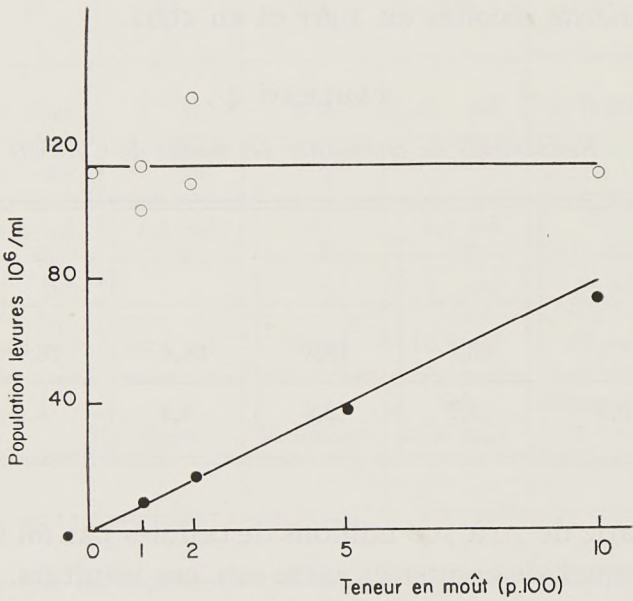


FIG. 2.

- Milieu VII (glucose + moût)
- Milieu I (milieu complet)

Le calcul de la droite de régression donne $y' = 20 (\pm 16) x + 113 (\pm 8)$. Comme on pouvait s'y attendre, b n'est pas significativement distinct de zéro et la courbe ne passe plus par l'origine, mais est sensiblement parallèle à l'axe des x .

Autrement dit la croissance obtenue est la même quelle que soit la dose de moût ajoutée. Celui-ci ne joue plus aucun rôle. Il faut donc rechercher les facteurs limitants parmi les 3 groupes de composés : azotés, sels minéraux et vitamines.

Les valeurs trouvées pour b et $a - b\bar{x}$ n'ont pas une signification absolue, le glucose étant ici le facteur limitant, l'aération, l'ensemencement et d'autres facteurs peuvent modifier ces valeurs.

2) Croissance sur les autres milieux

Lorsqu'au milieu I on enlève un constituant : vitamines, sels minéraux ou azote, les courbes du rendement de croissance en fonction des teneurs du milieu en moût sont, aux erreurs d'expérience près, des droites passant par l'origine (graphique 3).

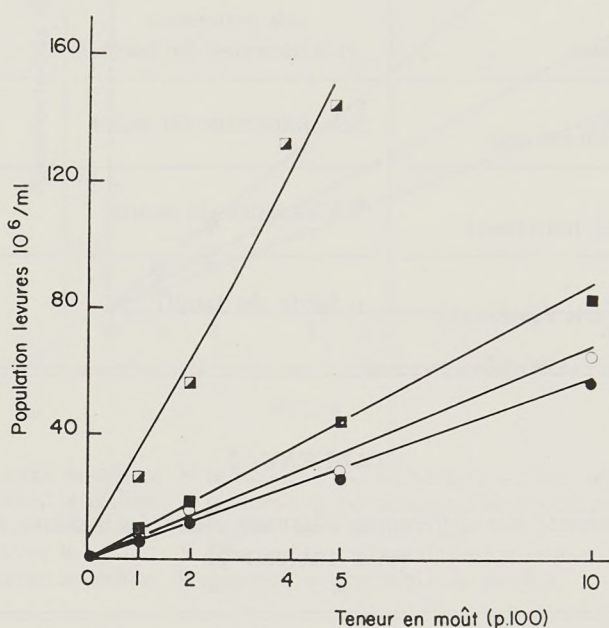


FIG. 3.

- Milieu VII (glucose + moût)
- Milieu II (glucose + sels minéraux + moût)
- Milieu V (glucose + glycolose + moût)
- ▲ Milieu III (glucose + glycolose + sels minéraux + moût)

(Cependant, en ce qui concerne le milieu III, moût + azote + sels minéraux, la valeur de $a - b\bar{x}$ est plus grande que la valeur de l'ensemencement.)

La croissance est proportionnelle au moût qui agit suivant les cas en apportant soit de l'azote, soit des sels minéraux, soit des vitamines.

Le tableau 6 donne le rendement de croissance b' obtenu avec différents milieux.

Le tableau 7 permet de comparer les valeurs de b' obtenues en donnant les chances pour que les différences observées soient dues au hasard.

On voit que deux milieux seulement ont donné une différence significative avec le moût de départ : le milieu enrichi en azote et en sels minéraux et le milieu

enrichi seulement en azote. Encore convient-il de comparer ce dernier avec le milieu IV (moût + azote + vitamines) qui a donné une croissance qui n'est pas significativement différente du moût témoin. On peut donc conclure qu'il y a synergie dans l'action limitante de l'azote et des sels minéraux, une augmentation nette du rendement

TABLEAU 6

Rendements de croissance obtenus sur les différents milieux à base de moût de Clairette

Milieu utilisé	Facteur limitant	b'	Sb'
VII (moût + glucose)	—	61,6	3,10
VI (moût + vitamines)	Sels minéraux et azote du moût	68	6,7
V (moût + azote)	sels minéraux et vitamines du moût	81,9	7,0
IV (moût + azote + vitamines)	Sels minéraux du moût	60,9	7,0
III (moût + azote + sels minéraux)	Vitamines du moût	269	77,0
II (moût + vitamines + sels minéraux)	Azote du moût	63,6	12,9

TABLEAU 7

*Probabilité des différences obtenues entre les valeurs de b'
(voir tableau 6)*

N° des milieux	II	III	IV	V	VI
VII	0,84	< 0,01	0,36	< 0,01	0,29
VI	0,75	0,02	0,45	0,15	
V	0,25	0,02	0,05		
IV	0,85	0,015			
III	0,015				

de croissance n'étant obtenue que lorsque les deux sont ajoutés au moût. L'azote est probablement capable de donner seul une légère augmentation de rendement.

Nous verrons d'ailleurs plus loin que pour tous les autres moûts étudiés, l'addition d'azote seul a provoqué une nette augmentation du rendement de croissance.

D'autre part, l'addition de vitamines seules n'a jamais conduit pour les autres moûts, à une augmentation significative de ce rendement.

3) Influence du phosphore et du soufre

Lorsqu'on remplace dans le milieu V la solution de glycolle utilisée comme source d'azote, par une solution de phosphate d'ammoniaque ou de sulfate d'ammoniaque, on obtient une augmentation du rendement de croissance qui est hautement significative : de 82 ± 7 , ce rendement passe à 130 ± 10 . C'est ce que montre le graphique 4.

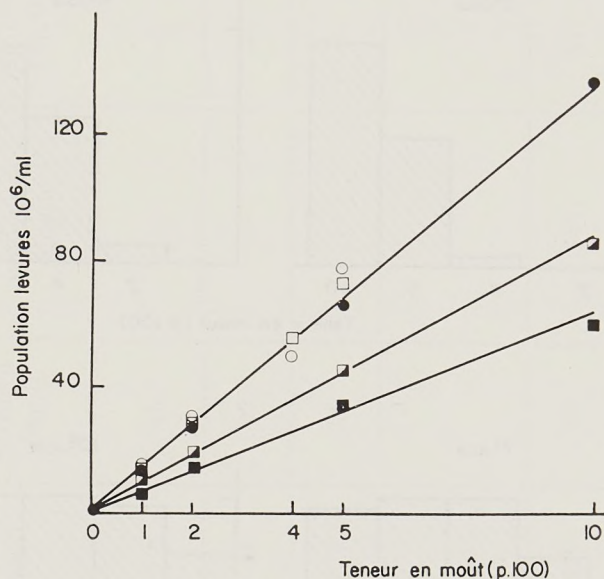


FIG. 4.

- Croissance obtenue avec le milieu V (glucose + phosphate et sulfate d'ammoniaque + moût)
- Croissance obtenue avec le milieu V (glucose + phosphate d'ammoniaque + moût)
- Croissance obtenue avec le milieu VII (glucose + moût)
- Croissance obtenue avec le milieu V (glucose + sulfate d'ammoniaque + moût)
- Croissance obtenue avec le milieu V (glucose + glycolle + moût)

Une question qui se pose à ce sujet, est celle de savoir si la différence de croissance entre les milieux où l'azote apporté est sous forme de phosphate ou de sulfate d'ammoniaque, et ceux où elle est sous forme de glycolle, doit être rapportée à un manque de phosphore (ou de soufre) dans le 2^e cas, ou au fait que le glycolle seul est une mauvaise source d'azote, ce qui a été vu par THORNE (1950) et plus récemment sur les levures de vin par PEYNAUD et LAFON-LAFOURCADE (1962).

Il n'est pas interdit de penser que la valeur de b' obtenue après addition d'azote dépend, dans une certaine mesure, de la forme d'azote apportée. Cependant, le fait que, d'une part la souche de levure utilisée pousse très bien avec le glycolle comme seule source d'azote lorsque le milieu est riche en vitamines et en sels minéraux, le fait que d'autre part la quantité d'azote apportée par 1 ml de solution de glycolle soit énormément plus élevée que ce qui peut être consommé par la levure, conduisent à conclure que, pour l'essentiel, l'augmentation de rendement de croissance obtenue doit être imputée à l'apport de phosphore.

Il est troublant de constater que l'apport de soufre semble donner dans le cas

de ce moût, une augmentation de rendement de croissance comparable, aux erreurs d'expérience près, à celle que donne le phosphore. Nous reprendrons cette discussion dans le cas du muscat. (cf. § IV)

4) Influence de l'état physiologique des levures sur les résultats trouvés

Pour les expériences que nous avons décrites, nous avons utilisé des précultures sur milieu yeast extract glucose qui est un milieu beaucoup plus riche en azote et facteurs de croissance que les milieux naturels sur lesquels se développent les levures de vin.

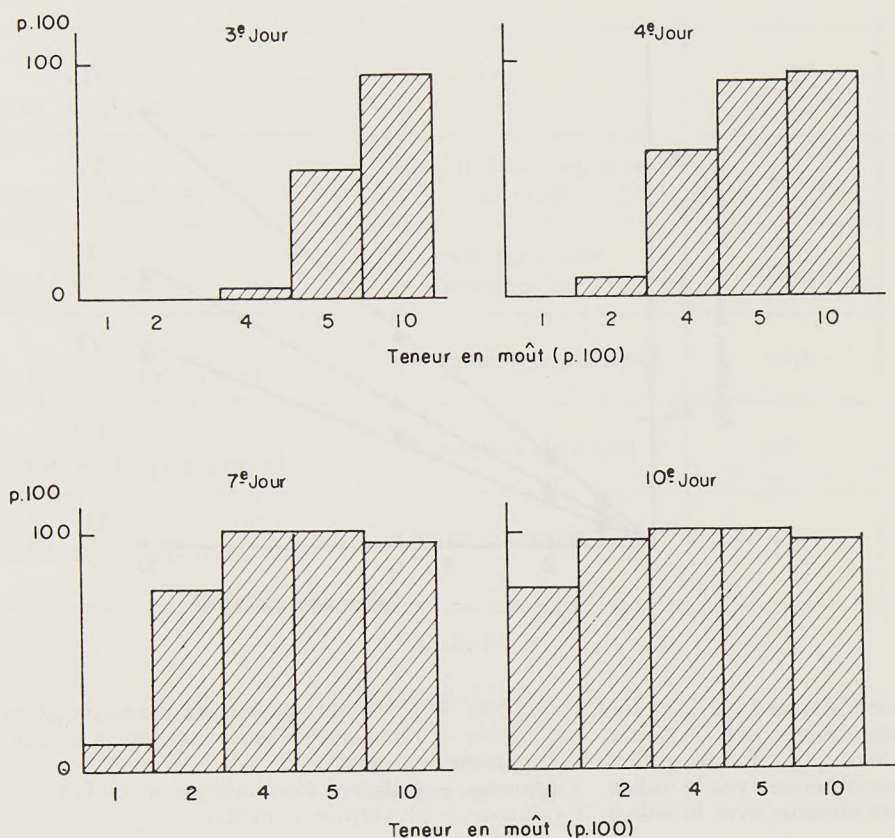


FIG. 5. — Rendement de croissance dans les milieux ensemencés avec des levures repiquées sur milieu ne contenant que du glucose et de l'azote. Croissance obtenue en p. 100 de la croissance maximum du témoin ensemencé avec des levures en activité, 3, 4, 7 et 10 jours après l'ensemencement.

Nous avons donc vérifié par l'expérience qui va suivre que le fait d'utiliser des levures repiquées sur un milieu très pauvre n'avait pas d'influence sur le taux de croissance obtenu.

Nous avons préparé, comme il a été vu précédemment, des échantillons à 1, 2, 3, 4, 5 et 10 p. 100 de moût. Le milieu utilisé était le milieu V à base de phosphate d'ammoniaque (voir § 1 : Matériel et méthode).

L'ensemencement était fait avec une suspension de levures dans l'eau distillée comme précédemment, mais au lieu de prendre une pré-culture sur yeast extract glucose en pleine activité, on prenait une culture ayant subi deux repiquages sur un milieu contenant seulement du glucose, du phosphate d'ammoniaque et du sulfate d'ammoniaque (10 ml de glucose 5 p. 100, 1 ml de solution à 6 g/l. de phosphate monoammonique et 2 g/l de sulfate d'ammoniaque).

TABLEAU 8

Composition des moûts de Clairette

N° des échantillons	Origine et année	Sucres (g/l)	Acidité (g/SO ₄ H ₂) par l	N total (mg/l)	N ammoniacal (mg/l)	N aminé Méthode Sørensen (mg/l)	N aminé des acides aminés libres Méthode Willstätter (mg/l)	N aminé des di- et tri- peptides (mg/l)	Arginine mg/l	« N assimilable » Méthode Tarentola (mg/l)
1	Hérault 1961	166	3,8	99	7	45	—	—	—	36
2	Hérault 1961	247	4,4	314	36	92	—	—	—	190
3	Drôme 1961	206	1,8	123	8	26	—	—	—	70
4	Drôme 1962	155	4,7	350	120	92	101	54	400	290
5	Drôme 1962	174	3,9	371	70	89	144	70	448	291
6	Hérault 1962	170	3,1	210	31	61	51	55	200	—
7	Hérault 1962	138	1,9	98	20	42	45	36	144	64

N assimilé lors des expériences sur le rendement de croissance mg/l.

La croissance de cette culture s'était arrêtée dès le premier repiquage. L'ensemencement était fait avec 80 000 cellules environ dans 0,1 ml de suspension dans l'eau distillée.

La croissance était suivie par numération tous les jours.

Le graphique 5 résume les résultats de cette expérience. La croissance maximum était atteinte en 4 jours dans les milieux contenant 10 p. 100 de moût, en 5 jours, dans les milieux contenant 5 p. 100 de moût, en 7 jours dans les milieux à 4 p. 100, et seulement en 10 jours dans les milieux à 1 p. 100, mais la croissance obtenue en fin d'expérience n'était pas différente de celle obtenue avec le même milieu ensemencé avec des levures en pleine activité.

Nous n'avons donc, par la suite, utilisé que des précultures sur yeast extract, ce qui permettait de diminuer la durée des expériences et ne pouvait en rien modifier l'interprétation des résultats.

C) ÉTUDE ANALYTIQUE

1) Azote assimilable

Le tableau 8 donne l'ensemble des résultats des analyses effectuées sur les moûts étudiés.

La comparaison avec le tableau 4 montre — comme il fallait s'y attendre, — que les moûts pour lesquels *b* est le plus grand, sont aussi les plus riches en azote.

Il convient de remarquer à ce sujet que l'azote du moût n'a jamais été consommé en totalité par les levures dans nos expériences.

Le chiffre donné pour l'azote assimilé est la moyenne des résultats donnés par les dosages dans les milieux VII à 5 et 10 p. 100 de moût (voir à ce sujet le paragraphe 1 : Matériel et méthodes).

Pour les moûts de 1961 pour lesquels ces dosages n'ont pas été faits, nous donnons à titre indicatif les résultats des dosages de l'azote dit « assimilable » obtenus par la méthode TARENTOLA (1953).

L'azote assimilé, dosé par notre méthode, correspond à peu près à la somme : azote ammoniacal + azote aminé libre dosé par la méthode à l'alcool.

Pour le moût n° 7 il correspond à la somme : azote aminé des acides aminés libres + azote ammoniacal et l'on peut penser que ce sont les acides aminés et les sels ammoniacaux qui ont été effectivement consommés, puisque ce sont les formes d'azote connues pour être les plus facilement assimilables. Cependant on sait aussi que les peptides peuvent être eux aussi utilisés par la levure (THORNE, 1950).

Le tableau 9 donne la composition qualitative de l'azote aminé des échantillons. Conformément aux résultats trouvés par divers auteurs, DUPONT (1953), CASTOR (1956), LAFON-LAFOURCADE et GUIMBERTEAU (1962), l'alanine et la proline sont toujours présents, la première en quantité importante.

Parmi les acides aminés basiques, l'arginine est très abondante (tabl. 8). Lorsqu'elle est présente en quantité particulièrement importante, la réaction d'Erlich est positive pour la citrulline. Bien que la seule reconnaissance par chromatographie ne permette pas d'affirmer l'existence d'une espèce chimique dans un milieu, la présence de la citrulline est ici d'autant plus vraisemblable qu'elle est un produit intermédiaire dans les réaction de synthèse de l'arginine.

TABLEAU 9

Composition des moûts de Clairette en acides aminés

N° des échantillons → Acides aminés ↓	1	2	3	4	4 bis	5	5 bis	6	7
Lysine	0	0	—	0	+	0	0	0	+
Histidine	0	+	0	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	++	—	++	++	++	++	+	+
Acide glutamique	+	0	+	+	+	+	+	+	+
Acide aspartique	+	—	+	+	0	+	—	+	+
Sérine	+	+	+	+	—	+	0	+	+
Thréonine	—	—	+	+	0	+	0	+	—
Cystine	0	0	0	+	++	+	+	+	+
Proline	—	+	+	++	++	++	++	+	+
Phénylalanine	0	+	—	+	+	+	+	+	0
Tyrosine	0	+	0	+	0	—	0	—	—
Tryptophane	0	0	+	+	0	+	0	+	+
Glycocolé	0	0	—	0	+	0	—	0	0
Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	0	+	+	+	+	+	+	+	—
Leucine et Isoleucine	0	+	+	+	++	+	++	+	—
Acide γ amino butyrique	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrulline	0	+	0	+	0	+	0	—	0

Légende : + acide aminé présent
 ++ acide aminé présent en grande quantité
 — acide aminé en trace
 0 acide aminé absent
 4 bis : échantillon 4 ayant subi l'hydrolyse chlorhydrique
 5 bis : échantillon 5 après hydrolyse chlorhydrique

L'histidine existe dans la plupart des moûts, par contre la lysine est rare.

Parmi les acides aminés soufrés, seule la cystine a pu être mise en évidence ; la réaction de WINEGARD et TOENIES est positive pour la méthionine dans les échantillons n° 5 et 6.

Parmi les diacides. mono-aminés, l'acide aspartique est habituellement présent

mais en plus ou moins grande quantité ; l'acide glutamique généralement abondant, manque dans un moût.

En dehors de la proline déjà citée, on trouve parmi les acides aminés cycliques : de la phényl-alanine dans presque tous les moûts mais parfois en faible quantité, de la tyrosine et du tryptophane mis en évidence seulement par réaction colorée.

Enfin chez les acides aminés aliphatiques, nous rencontrons surtout de la valine, de la leucine ou de l'isoleucine presque dans tous les moûts. L'acide γ amino-butyrrique existe toujours et en grande quantité. Le glycocole au contraire est rare et toujours en faible quantité lorsqu'il existe.

Les échantillons soumis à l'hydrolyse chlorhydrique donnent des résultats identiques. Il semble que par rapport au témoin, on obtienne dans ce cas une légère augmentation de la leucine, de la proline et de la cystine.

Nous avons constaté que tous les chromatogrammes portent, outre les taches correspondant aux acides aminés du tableau 9, deux taches non identifiées. La première qui est peu nette, n'apparaît pas pour tous les échantillons et disparaît à l'hydrolyse. Elle correspond probablement à la glutamine. La deuxième est importante et existe pour tous les échantillons. Elle a, dans le butanol acétique et le phénol à pH 4,4 les mêmes R_f que l'éthanolamine.

Elle semble diminuer un peu à l'hydrolyse, mais ne disparaît pas.

2) *Influence du degré de maturité*

Le tableau 10 permet de comparer entre eux des moûts issus de raisins cueillis la même année à deux stades de maturité. Nous appelons « verts » les raisins cueillis environ un mois avant les vendanges, « mûrs » les raisins cueillis au moment des vendanges.

TABLEAU 10

Influence de la maturité sur la composition des moûts de Clairette

N° de l'échantillon	Maturité	Sucre Acidité	N ammoniacal (% N total)	N des acides aminés libres (% d'N total)	N des di- et des tri- peptides (% d'N total)	N assimilé (% d'N total)	Rendement de croissance en millions de cellules par γ d'N assimilé
<i>Moûts de la Drôme</i>							
4	vert	32	34	28	18	82	1,9
5	mûr	44	18	38	19	78	2,6
<i>Moûts de l'Hérault</i>							
6	vert	54	14	23	25	—	—
7	mûr	72	20	46	36	65	3,2

Dans le cas des deux échantillons de la Drôme, la récolte a été faite sur des parcelles différentes, mais dans le cas des moûts de l'Hérault, la récolte a été faite sur la même parcelle en réalisant un échantillonnage moyen de la parcelle.

Une période de fortes pluies au moment des vendanges, a sans doute troublé, dans ce cas, l'évolution normale des raisins.

On peut constater cependant une baisse de la teneur en azote ammoniacal pendant la maturation et une augmentation du pourcentage d'acides aminés libres et, de façon moins nette, des petits polypeptides. Ce phénomène a été décrit par PEYNAUD et MAURIE (1953) et LAFON-LAFOURCADE et GUIMBERTEAU (1962).

On constate parallèlement une baisse du pourcentage d'azote assimilé. Par contre, il semble que le rendement de croissance exprimé en fonction de l'azote assimilé, augmente.

3) Influence du terroir

Aucune influence nette du terroir au cours d'une même année ne peut être vue sur la composition des moûts, sauf sur la richesse en sucre et le rapport sucre/acidité toujours supérieurs dans l'Hérault. Les valeurs que peut prendre *b* et la richesse en azote semblent indépendantes de l'origine du moût.

IV. — ÉTUDE DU MUSCAT BLANC A PETITS GRAINS

A) ÉTUDE DU RENDEMENT DE CROISSANCE

Le tableau II donne les résultats du calcul du rendement de croissance pour 8 échantillons de muscat récoltés en 1961 et en 1962.

TABLEAU II
Rendements de croissance des moûts de Muscat

Echantillons	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>b</i>	65,7	24,8	29,3	47	43,4	30,1	30	18,9
<i>Sb</i>	4,2	2,0	2,5	3,9	3,6	1,3	3,3	1,6

TABLEAU I2
Probabilité des différences obtenues entre les divers moûts de Muscat

N° des échantillons	8	7	6	5	4	3	2
1	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
2	0,02	0,19	0,07	< 0,01	< 0,01	0,20	
3	< 0,01	0,85	0,02	< 0,01	< 0,01		
4	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,45			
5	< 0,01	0,02	< 0,01				
6	< 0,01	> 0,9					
7	< 0,01						

Ce rendement varie de 200 à 700 millions de cellules par ml de moût.

Le tableau 12 permet de comparer entre eux ces résultats. La plupart du temps, les différences sont significatives. Il y a donc également pour le muscat de grosses différences dans la valeur nutritive des moûts pour les levures bien que la fluctuation soit plus faible que pour les moûts de clairette.

Pour la plupart des moûts de muscat, comme pour les moûts de clairette, la courbe du rendement de croissance en fonction de la teneur du milieu en moût, est une droite. Cependant, pour trois des échantillons, il semble qu'il n'en soit plus de même et que la courbe de croissance subisse une inflexion à partir d'une teneur en moût de 5 p. 100. Le graphique 6 donne, à titre d'exemple, les courbes de croissance obtenues avec les échantillons n° 8 et n° 4, le troisième échantillon ayant présenté cette anomalie était le n° 2.

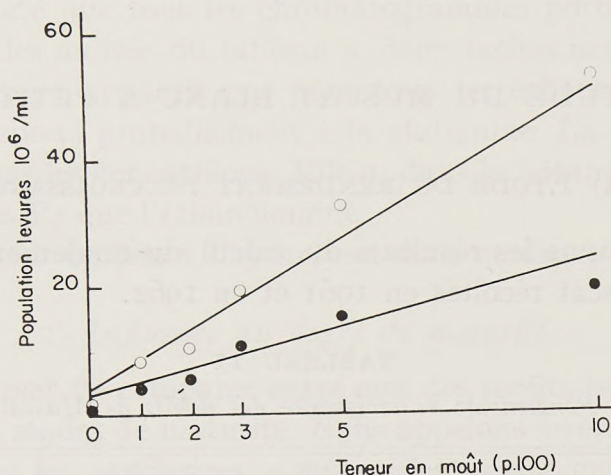


FIG. 6. — Rendements de croissance des muscats n° 4 et 8

● Échantillon n° 8

○ Échantillon n° 4

On pourrait expliquer cette anomalie par l'action d'une substance inhibitrice. La présence dans le muscat de substances inhibitrices de la fermentation est connue, (NILOV, 1962).

Quoiqu'il en soit, l'erreur expérimentale que provoque ce phénomène n'est pas telle que nous ne puissions pas le négliger dans ce qui va suivre. L'examen du graphique 5 montre que cette erreur expérimentale conduit à donner à b une valeur inférieure à la valeur réelle probable et à surestimer $(a - b\bar{x})$ qui devient nettement supérieur à l'ensemencement.

B) ÉTUDE DES FACTEURS LIMITANT LA CROISSANCE

Sur un moût, pris comme exemple, nous donnerons le résultat de l'étude des facteurs limitant la croissance.

1) Croissance sur milieu I

On trouvera sur le graphique 7 la courbe du rendement de croissance obtenue avec les milieux I contenant du glucose, des sels minéraux, des vitamines et du glycocole et des doses croissantes de moût.

Le calcul de la droite de régression donne $y' = 18,6 (\pm 13,4) x + 110 (\pm 5)$

Donc, comme il a été vu avec la clairette, le rendement de croissance sur les milieux I est pratiquement indépendant de la teneur en moût de l'échantillon. Il n'y a, dans les conditions de nos expériences, d'autre facteur limitant que l'azote, les sels minéraux et les vitamines.

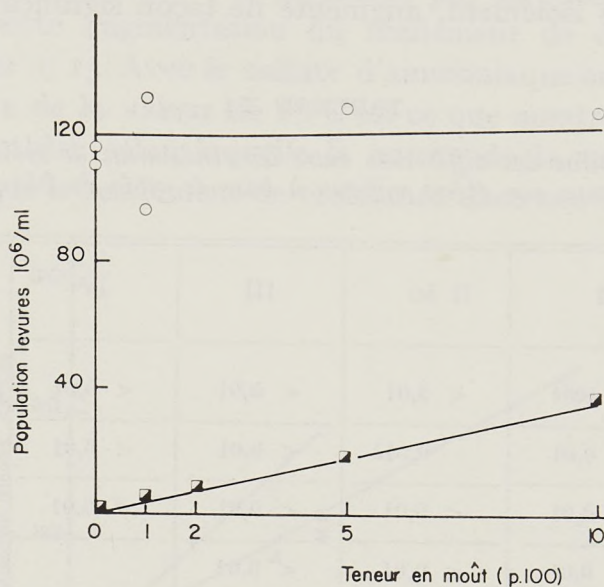


FIG. 7.

○ Milieu I (milieu complet)
 ■ Milieu VII (glucose + moût)

2) Croissance sur les autres milieux

On trouvera dans le tableau 13 les rendements de croissance b' obtenus avec différents milieux.

TABLEAU 13

Rendements de croissance obtenus sur différents milieux à base de moût de Muscat

Milieux utilisés	Facteur limitant	b'	Sb'
VII moût + glucose	—	15,1	1,6
VI moût + vitamines	Sels minéraux et azote du moût	14,4	6,8
V moût + azote	Sels minéraux et vitamines du moût	89,2	5,5
IV moût + azote + vitamines	Sels minéraux du moût	140	13
III moût + azote + sels minéraux	Vitamines du moût	265	8,5
II moût + vitamines + sels minéraux	Azote du moût	38,1	4,8
II bis moût + sels minéraux	Azote et vitamines du moût	30,7	2,3

Le tableau 14 permet de comparer les valeurs de b' obtenues.

Comme pour le moût de clairette étudié dans le paragraphe précédent, on obtient la plus forte augmentation du rendement de croissance pour les milieux enrichis à la fois en azote et en sels minéraux. Cependant ici chacun de ces deux éléments nutritifs pris isolément, augmente de façon significative le rendement de croissance.

TABLEAU 14

Probabilité des différences entre les rendements de croissance obtenus sur divers milieux à base de moût de Muscat

N° des milieux	II	II bis	III	IV	V	VI
VII	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,9
VI	< 0,01	0,015	< 0,01	< 0,01	< 0,01	
V	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01		
IV	< 0,01	< 0,01	< 0,01			
III	< 0,01	< 0,01				
II bis	0,20					

Le facteur limitant du rendement de croissance dans le moût étudié est donc à la fois l'azote et les sels minéraux.

Les vitamines jouent un rôle beaucoup moindre. Le graphique 8 donne les courbes de croissance obtenues avec chacun des milieux.

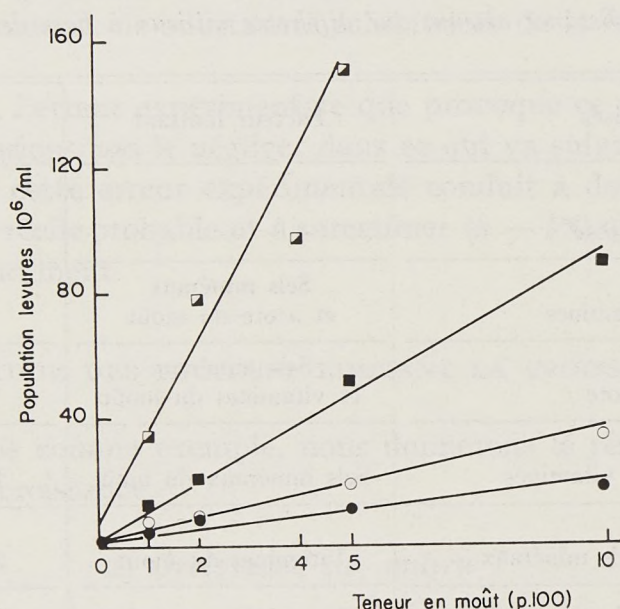


FIG. 8.

- Milieu VII (glucose + moût)
- Milieu 2 bis (glucose + moût + sels minéraux)
- Milieu V (glucose + glycolle + moût)
- Milieu III (glucose + glycolle + sels minéraux)

3) Influence du phosphore et du soufre

En remplaçant dans le milieu V le glyocolle par du phosphate d'ammoniaque, nous obtenons une nette augmentation du rendement de croissance puisque b' passe de 89 ± 6 à 142 ± 13 . Avec le sulfate d'ammoniaque on n'obtient pas d'augmentation significative de la valeur de b' . C'est ce que montre le graphique 9. Ceci tend à vérifier l'hypothèse selon laquelle la nature de la source d'azote n'a pas une grande influence sur le rendement de croissance dans nos expériences.

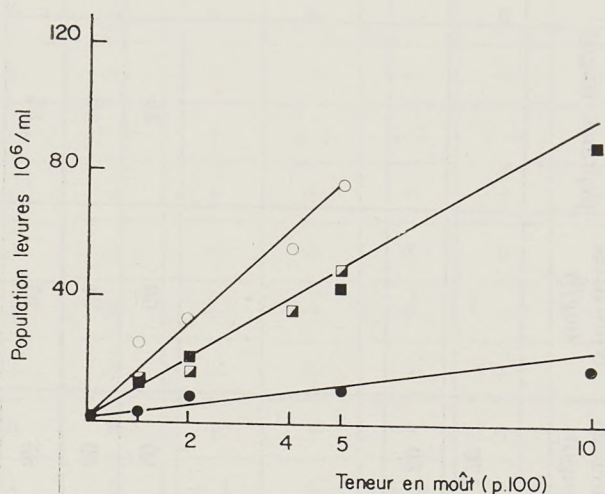


FIG. 9.

- Milieu VII (glucose + moût)
- Milieu V (glucose + phosphate d'ammoniaque + moût)
- Milieu V à base de glyocolle
- ◻ Milieu V à base de sulfate d'ammoniaque

Comme on pouvait s'y attendre, connaissant les besoins élevés de la levure en phosphore, on peut donc penser que parmi les matières minérales du moût le phosphore est un facteur limitant. Comme on ne peut envisager d'étudier séparément dans le cadre d'un tel travail, tous les composés minéraux du moût, nous n'avons pas poussé plus avant cette expérimentation, laissant de côté la question de savoir dans quelle mesure et dans quels cas d'autres éléments pouvaient jouer un rôle.

C) ÉTUDE ANALYTIQUE

1) Azote assimilable

Le tableau 15 donne l'ensemble des résultats des analyses effectuées sur les moûts étudiés. On notera que, pour le muscat comme pour la clairette, l'azote du moût n'a pas été totalement consommé par les levures dans nos expériences.

Pour tous ces moûts, sauf un, l'azote assimilé est en quantité supérieure à la somme acides aminés + ammoniaque, et pour trois d'entre eux, en quantité un peu supérieure à la somme ammoniaque + acides aminés + azote aminé des dipeptides et tripeptides.

TABLEAU I5

Composition des mouls de Muscat

N° des échantillons	Origine et année	Sucre (g/l)	Acidité (g/l SO_4H_2)	N total (mg/litre)	N amminoaciel (mg/l)	N aminé méthode Sörensen (mg/l)	N (1) aminé méthode Willstätter (mg/l)	N aminé des di- et tri-peptides (mg/l)	Arginine (mg/l)	N assimilable Tarentola (mg/l)	N assimilable, (% d'N total)
1	Hérault 1961	270	3,3	618	41	176	—	—	—	369	59
2	Drôme 1961	206	3,5	366	50	80	—	—	—	259	70
3	Hérault 1962	210	4,9	139	39	40	60	35	124	—	—
4	Hérault 1962	269	2,1	335	52	69	81	40	376	146	43
5	Hérault 1962	275	4,5	368	83	85	97	54	359	280	76
6	Drôme 1962	157	5,4	333	127	49	64	31	310	245	73
7	Drôme 1962	174	3,9	212	33	59	99	28	280	123	58
8	Hérault 1962	249	3,3	106	15	14	19	10	0	68	64

(1) Azote aminé des acides aminés libres y compris l'arginine.

Le tableau 16 donne la composition des acides aminés libres trouvés dans les échantillons par chromatographie. Les résultats sont semblables à ceux que nous avons trouvés pour les moûts de clairette. Notons, cependant, que l'acide aspartique

TABLEAU 16

Composition des moûts de Muscat en acides aminés libres

Échantillons	1	2	3	4	5	6	6 bis	7	7 bis	8
Lysine	0	0	0	0	—	0	—	0	+	0
Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Arginine	++	++	+	++	++	++	++	++	+	0
Acide glutamique....	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Acide aspartique.....	+	+	—	+	0	0	0	+	0	0
Sérine	+	0	+	+	+	+	+	++	+	0
Thréonine.....	+	+	+	+	—	+	+	++	+	0
Cystine	0	0	+	+	+	+	+	+	++	0
Proline	+	+	++	+	++	+	+	++	++	+
Phénylalanine	—	+	—	+	+	+	+	+	+	0
Tyrosine	+	+	—	—	—	—	—	—	0	0
Tryptophane	+	+	+	+	—	—	0	+	0	0
Glycocolle	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Leucine et isoleucine..	+	0	+	+	+	—	+	+	+	—
Acide γ amino butyrique	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Citrulline	+	+	—	+	+	+	0	+	0	0

Légende :

- + acide aminé présent
- ++ acide aminé présent en grande quantité
- acide aminé à l'état de trace
- 0 acide aminé absent
- 6 bis échantillon 6 ayant subi l'hydrolyse chlorhydrique
- 7 bis échantillon 7 ayant subi l'hydrolyse chlorhydrique

manque assez souvent et que le moût n° 7 renferme une proportion particulièrement grande d'acides aminés alcools. D'autre part, l'hydrolyse chlorhydrique des acides aminés et des petits polypeptides du moût n° 6 fait apparaître sur les chro-

matogrammes une tache importante de glycolle. Les taches non identifiées que nous avons signalées pour les chromatogrammes de clairette existent aussi sur les chromatogrammes de muscat.

2) Influence du degré de maturité

Le tableau 17 permet de comparer entre eux des moûts issus de raisins cueillis la même année à deux stades de maturité.

Nous appellerons « verts » les raisins cueillis environ un mois avant les vendanges et « mûrs » les raisins cueillis au moment des vendanges.

TABLEAU 17

Influence de la maturité sur la composition des moûts de Muscat

N° du moût	Maturité	Sucre Acidité	N ammo- niacal (% d'N total)	N des acides aminés libres (% d'N total)	N des di- et tripeptides (% d'N total)	N assimilé (% d'N total)	Rendement de croissance en millions de cellules par γ d'azote assimilé
Moût de la Drôme							
6	vert	29	38	19	9	73	1,2
7	mûr	44	15	46	13	58	2,4
Moût de l'Hérault							
3	vert	43	27	43	25	—	—
4	mûr	128	15	24	12	43	3,2

Dans le cas des deux échantillons de l'Hérault, la récolte a été faite sur la même parcelle, la première fois en réalisant un échantillonnage moyen de la parcelle, la deuxième fois en réalisant l'échantillonnage sur un lot important de vendange prélevé lors de la 2^e coupe, la récolte s'étant faite en deux fois. Les raisins correspondant à ce deuxième échantillonnage peuvent être considérés comme légèrement surmûris.

Les moûts de la Drôme provenaient de deux parcelles différentes.

Nous observons pendant la maturation une baisse de la teneur en ammoniacque et une baisse du pourcentage d'azote assimilé par les levures. Il semble qu'il y ait augmentation du rendement de croissance exprimé par le nombre de cellules ayant poussé sur un millilitre de moût à égalité de teneur en azote susceptible d'être assimilé.

3) Influence du terroir.

Pas plus que pour la clairette, l'influence du terroir n'a pu être mise en évidence, sauf en ce qui concerne la teneur en sucre toujours plus élevée dans l'Hérault. Les teneurs en acides aminés, peptides et ammoniacque, varient dans les mêmes limites, quelle que soit la région de production envisagée.

V. — DISCUSSION

A) Comparaison de la Clairette et du Muscat blanc à petits grains

La comparaison des tableaux 8 et 15 et des tableaux 11 et 17 ne montre aucune différence entre la clairette et le muscat en ce qui concerne les teneurs en azote total ni en ce qui concerne les pourcentages des diverses formes d'azote dosées (azote ammoniacal, azote aminé, peptides, arginine).

La comparaison des tableaux 9 et 16 ne montrent pas davantage de différence dans la composition en acides aminés libres. Comme par ailleurs les valeurs du rendement de croissance oscillent entre les mêmes limites pour les deux cépages on peut penser qu'il n'y aura pas de différence entre eux quant à l'aptitude à être utilisés pour la fabrication de vins naturellement doux ou de mousseux par la méthode rurale.

TABLEAU 18

Quantité de levures fournies par les divers facteurs de croissance de 1 ml de moût

Facteur limitant	Récolte de levures en millions de cellules données par 1 ml de moût de			
	Clairette n° 4	Clairette n° 5	Muscat n° 6	Muscat n° 7
Témoin ⁽¹⁾	560	760	300	300
Azote du moût	570	780	320	530
Sels minéraux du moût ...	630	750	780	1550
Vitamines du moût	2 900	2 840	2 150	2 800

⁽¹⁾ Quantité de levures pouvant être données par un millilitre de moût, soit dix fois la valeur de *b* donné pour ces moûts dans les tableaux 4 et 9.

Le tableau 18 donne la récolte de levures exprimée en millions de cellules que peuvent donner respectivement les vitamines, les sels minéraux ou l'azote de 1 ml de moût. Nous avons calculé ces valeurs à partir d'expériences effectuées en suivant le protocole expérimental décrit au paragraphe 1.

On voit sur ce tableau, qu'il n'y a vraisemblablement pas de différences, aux erreurs d'expérience près, dans la teneur en vitamines et dans la teneur en sels minéraux.

De même, si l'on compare les claires n° 4 et 5 d'une part et d'autre part les muscats n° 6 et 7 qui ont été récoltés à des stades de maturité différents, on ne voit pas non plus de différence sensible sauf, peut-être en ce qui concerne les sels minéraux du muscat n° 7.

Nous avons étudié deux cépages dont les raisins servent à la fabrication de vins doux. D'autres sont utilisés dans le même but, ce sont; par exemple, le *Mauzac*, le *Chenin*, le *Semillon*. On pourrait, par la méthode que nous avons suivie, les comparer à des cépages utilisés surtout pour la fabrication de vins secs. Si on mettait en évidence des différences d'aptitudes entre cépages ou entre clones, on aurait une base pour la sélection ampélographique.

B) Signification pratique des résultats

Lawrence ATKIN et ses collaborateurs (1949) ont étudié séparément la croissance des levures et la fermentation dans des moûts de brasserie et des milieux synthétiques.

Leurs travaux ont montré qu'il existe des facteurs accroissant la vitesse de fermentation, différents des facteurs de croissance réclamés par la levure. De plus, des facteurs comme l'inositol, qui ne jouent aucun rôle dans les expériences portant sur la mesure de la croissance lorsque la souche étudiée peut les synthétiser peuvent devenir facteurs limitants de la vitesse de fermentation s'ils ne sont pas synthétisés assez vite.

Cependant dans les conditions de la pratique il n'y a pas de fermentation sans qu'elle ne s'accompagne d'une croissance notable de la population de levures.

D'autre part, la vitesse de fermentation étant, pour des conditions de milieu déterminées, proportionnelle au nombre de cellules et à l'activité de celles-ci, les facteurs de croissance auront une influence sur la vitesse de la fermentation dès lors que celle-ci s'accompagnera d'une multiplication importante.

Nous pouvons donc penser que le rendement de croissance illustre assez bien l'aptitude d'un moût à être fermenté par une souche de levures donnée et on doit pouvoir expérimentalement définir une valeur de b pour laquelle un moût de richesse saccharine déterminée ne puisse plus être fermenté complètement par cette souche.

En effet, nous avons vu que les méthodes de stabilisation biologique de certains vins vis-à-vis des levures, consistent à épuiser le milieu en éléments nutritifs en provoquant la formation de nouvelles cellules. Le calcul du rendement de croissance du moût permet de connaître le nombre de millions de cellules que peut produire un millilitre de moût soit $10 \times b$, b étant la pente de la droite de régression de la courbe de croissance en fonction de la teneur en moût des milieux de culture (voir paragraphe 1), $10 \times b$ représente théoriquement la quantité de levures à faire pousser sur ce moût sans consommer tout le sucre pour obtenir un vin doux, stable vis-à-vis des levures.

Pour les vins mousseux il faut connaître la valeur que b doit prendre dans les mi-fermentés avant la mise en bouteille pour que la prise de mousse s'effectue dans de bonnes conditions.

La mesure de b faite sur les différents mi-fermentés obtenus lors des filtrations successives doit permettre d'arrêter celles-ci au moment opportun.

On ne peut se contenter de mesurer b sur le moût de départ car la quantité de levures éliminées à chaque filtration n'est pas constante.

Dans le Midi de la France les populations de levures dans le moût en fermentation oscillent autour de 80 millions de cellules/cm³ (GALZY, 1958-a) pour des moûts

qui, nous l'avons vu, peuvent permettre la croissance de 200 à 700 millions de cellules/cm³.

Théoriquement, 3 à 10 filtrations seraient alors nécessaires pour stériliser biologiquement le moût. Ce chiffre est sans doute sous-estimé, du fait qu'elles se font avant que la fermentation ait franchement démarré.

A la Cave Coopérative de Die, trois à quatre filtrations sont pratiquées pour obtenir le vin doux qui subira la prise de mousse.

Étant donné les conditions expérimentales, nous n'avons étudié par le calcul du rendement de croissance, que les facteurs limitants en aérobiose. On sait que l'ergostérol, par exemple, est un facteur de croissance nécessaire aux levures en anaérobiose (ANDREASEN et STIER, 1953).

Sur ce point, une étude complémentaire serait nécessaire, quoique le système des filtrations successives des milieux en fermentation, conduite à une aération importante de ceux-ci.

VI. — CONCLUSIONS

Le calcul du rendement de croissance des levures sur moût de raisin ne permet pas de trouver de différences entre les deux cépages étudiés. Par conséquent, le muscat et la clairette présentent les mêmes aptitudes pour la fabrication de mousseux ou de vins doux par stabilisation biologique.

Les résultats analytiques donnent quelques précisions sur la nature des matières azotées des moûts issus de ces deux cépages, en particulier sur leurs teneurs en acides aminés libres.

On observe des variations très importantes du rendement de croissance donné par les moûts d'un même cépage, récolté une même année sur une même aire géographique.

La recherche des facteurs limitant la croissance des levures montre une action comparable de l'azote et des sels minéraux. Les vitamines ne sont pas le facteur limitant dans nos expériences.

Reçu pour publication en juillet 1963.

SUMMARY

FACTORS LIMITING YEAST GROWTH IN THE MUSTS OF « CLAIRETTE »
AND « MUSCAT BLANC A PETITS GRAINS »

Having described a method for measuring the efficiency of growth of yeasts in grape must, the author looked for the factors other than sugar which limited the development of yeast in 2 given grape musts (*Clairrette* and *Muscat*). It seemed that nitrogen was the most important of these, with mineral salts and particularly phosphorus, playing important role. A biological test based on a calculation of the increase in growth in must was proposed for controlling the production of sparkling wines or sweet wines prepared by biological stabilization.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDREASEN A., STIER J. T. B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, 23-36.
- ATKIN L., GRAY P. P., MORIS W., FEINSTEIN M., 1949. Facteurs de croissance et de fermentation de différentes levures de brasserie. *Biochim. Biophys. Acta*, **3**, 692.
- IDAN P., ANDRÉ L., 1958. Sur la composition en acides aminés de quelques vins. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 403.
- CASTOR J. G. B., ARCHER T. E., 1956. Amino acids in muts and wines. *Amer. J. Enol.*, **7**, 19-25.
- CAZALIS F., 1900. *Traité pratique de l'art de faire le vin*. Masson, 342-345.
- DEIBNER L., 1953. Principales données actuelles sur les facteurs de la stabilité biologique des vins sucrés ou des vins spéciaux et sur la régulation de cette dernière. *Rev. Ferment. Industr. Aliment.*, 205-212.
- DELLE, 1911. *C. R. de la Station vinicole des viticulteurs et des œnologues russes pour la période de 1908-1909-1911*. D'après DEIBNER (*op. cit.*).
- DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1960. Dosage de l'azote ammoniacal et des substances azotées macromoléculaires par la méthode des échangeurs de cations. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **618**, 337.
- DUPONT G., 1953. Identification des acides aminés du moût de raisin, par chromatographie sur papier. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 95-98.
- GALET P., 1958. *Cépages et Vignobles de France*, **2**, 712.
- GALZY P., 1958-a. Origine de la microflore des vins. *Progr. Agric. Vitic.*, **3**, 58.
- GALZY P., 1958-b. Observations sur l'utilisation d'un électrophotomètre pour l'étude de la croissance des levures. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 453.
- GALZY P., 1959. Étude des possibilités d'utilisation en technologie d'une levure à déficience respiratoire. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 321.
- GUILHEM H., 1950. *La Blanquette de Limoux*, **84**.
- KOTCHERGA P., 1940. « Nomogramme » de stabilité du vin. *Vinodelie i Vinogradarstvo*, **2**, 10. (D'après DEIBNER, *opt.cit.*).
- LAFON-LAFOURCADE S., GUIMBERTEAU G., 1962. Évolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins. *Vitis*, **3**, 130.
- MAC PHERSON H. T., 1946. *Biochem. J.*, **40**, 470 (d'après FROMAGEOT et DESNUELLES P) = Dosage de quelques acides aminés dans les milieux biologiques dans « Techniques de laboratoires », **11**, 466, Masson, 1947.
- NÈGRE E., 1951. Vins blancs doux et vins spontanément mousseux. *Vignes et Vins*, **17**, 27-29.
- NÈGRE E., MARTEAU G., CORDONNIER R., 1958. Étude des meilleurs moyens de stabiliser les vins en respectant leurs qualités intrinsèques. *Rapport 8^e Congrès O. I. V.* (d'après B. O. I. V.), **31**, 38-80-83.
- NILOV V., 1962. A propos des huiles volatiles des feuilles de vigne. *Vinodelie i Vinogradarstvo*, **4**, 28.
- OCHREMENKO N., 1947. 1948. Technologie du muscat blanc mousseux.. *Trav. Inst. Magaratch, U.R.S.S.*, **1**, fasc. I, Vins mousseux doux faiblement alcooliques. *Vinodelie i Vinogradarstvo*, **1**, (d'après DEIBNER, (*op. cit.*)).
- PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., 1962. Sur la nutrition azotée des levures de vin. *Rev. Ferment. Industr. Alim.*, **37**, 11.
- PEYNAUD E., MAURIE A., 1953. Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 15-25.
- ROOS L., ROLLAND J., 1903. Les vins mousseux de la Drôme. *Progr. Agric. Vitic.*, **32**, 169.
- SAMUELSON O., 1952. *Ion exchangers in analytical chemistry*. Stockholm, 167.
- SCHOUMAKOV A., 1934. Méthode de la régulation de la spirituosité du vin. *Trav. Stat. Centr. Œnol. Odessa U. R. S. S.*, **5** (d'après DEIBNER, *op. cit.*).
- TARENTOLA C., 1953. 7^e Congr. Intern. Vigne et Vin, Rome, 201, (d'après RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD : Analyse et contrôle des vins, 295).
- THORNE R. S. W., 1950. *The Brewer's Guardian*, **32**, janv.
- WILLSTÄTTER R., WALDSCHMITT LEITZ E., 1921. *Ber* **54**, 2988 (d'après BRUNEL A. : Traité pratique de chimie végétale, **3**, 501).

INFLUENCE DES PORTE-GREFFES SUR LA COMPOSITION MINÉRALE DES VINS

P. BÉNARD, C. JOURET et M. FLANZY

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

On a recherché l'influence possible du porte-greffe sur la composition minérale des vins.

Les essais ont été effectués sur des vins rosés et rouges provenant d'une parcelle de *Grenache* greffé sur neuf porte-greffes différents.

Les différences analytiques quantitatives des cations et anions minéraux dosés sont peu sensibles ; les deux porte-greffes issus de *Riparia* semblent pourtant absorber moins de potassium et plus de fer.

I. — INTRODUCTION

Le but de ce travail a été de rechercher l'influence possible de la nature du porte-greffe sur la composition minérale du moût et du vin correspondant d'un même cépage *vinifera*.

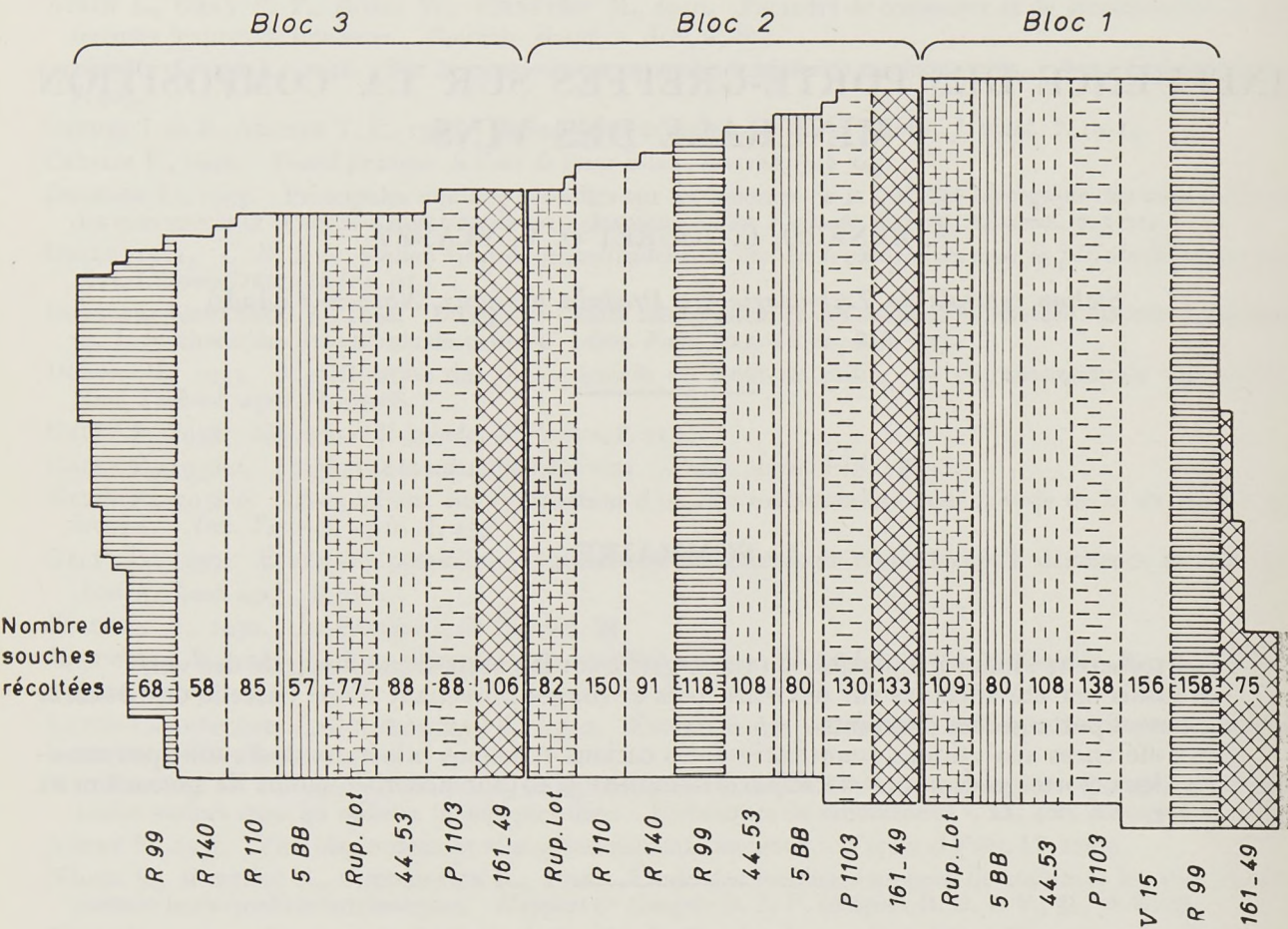
A cet effet, nous disposons d'une parcelle de *Grenache noir* greffé sur neuf porte-greffes différents : *Rupestris du Lot*, *Ruggieri 140* (*Berlandieri Rességuier* n° 2 × *Rupestris du Lot*), *Paulsen 1103* (*Berlandieri Rességuier* n° 2 × *Rupestris du Lot*), *Ritcher 99* (*Berlandieri Las Sorres* × *Rupestris du Lot*), *Ritcher 110* (*Berlandieri Rességuier* n° 2 × *Rupestris Martin*), *Couderc 161-49* (*Riparia gloire de Montpellier* × *Berlandieri Las Sorres*), *44-53 Malègue* (*Riparia Grand glabre* × *Rupestris du Lot* × *Cordifolia*), *5BB Teléki* (*Berlandieri* × *Riparia*), *Vivet 15* (*Rupestris* × *Berlandieri*).

La parcelle est répartie en 3 blocs et chacun des blocs est divisé en 3 rangées de souches du même porte-greffe.

La répartition des différents porte-greffes ainsi que le nombre des souches récoltées sont indiqués dans le plan ci-dessous (tabl. 1).

Il s'agit d'une parcelle du domaine expérimental de la Station centrale de Technologie végétale de Pech-Rouge à Gruissan (Aude). Le terrain d'origine secondaire

TABLEAU I



(marnes calcaires compactes de l'Aptien), a été récupéré sur une garrigue n'ayant apparemment jamais été cultivée. Le sol rocailleux avec très peu de terre fine, n'a reçu aucun engrais depuis le défoncement.

La récolte de 1962 représente la deuxième année de production.

II. — MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

La parcelle a été récoltée le 20 septembre 1962 en deux temps. Un premier passage avec une prise d'échantillon de grappe (grains et rafle) coupée à l'aide de ciseaux sur chaque souche des trois rangées de chacun des porte-greffes des blocs.

Cet échantillonnage prélevé au hasard, représentant 1 500 grains environ, était foulé et mis à fermenter dans un bocal de verre en chambre à 26°C.

La fermentation a été suivie par pesée des bocaux. A la fin de la fermentation, le vin de goutte était mélangé au vin de presse pour constituer l'échantillon de vin rouge.

Le reste des grappes de chaque série de porte-greffes d'un même bloc était récolté, foulé, égoutté, pressé et le moût (après mesure du degré réfractométrique et de l'acidité totale) était mis à fermenter dans des bouteilles de 2 litres. Ceci correspond à l'échantillon de vin rosé. Les vins rosés ont été sou tirés le 9 octobre, les vins rouges le 11 octobre.

On a effectué à ce moment une analyse succincte (tabl. 2 et 3). Les échantillons conservés en bouteille ont été analysés d'une façon plus complète en février 1963 (tabl. 4, 5, 6 et 7).

Le dosage du degré alcoolique a été fait par distillation et aérométrie ; pour l'acidité totale, l'acidité volatile, les cendres et l'alcalinité des cendres ainsi que pour le dosage des phosphates, sulfates, chlorures, on a utilisé les méthodes les plus couramment adoptées, décrites dans JAULMES (1952).

Le potassium et le sodium ont été dosés par spectrophotométrie de flamme (JOURET, POUX, 1961 ; JOURET, 1961) ; le calcium et le magnésium par complexométrie suivant BONASTRE (1959), le cuivre par la technique à la 2-2' diquinolyle décrite dans le manuel de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (1958), le fer par la technique de DEIBNER-BOUZIGUES (1952), et le manganèse par la méthode BOUZIGUES-BOUZIGUES (1956).

III. — RÉSULTATS

Les résultats des différentes analyses ont été groupés dans les tableaux suivants : (tableaux 2, 3, 4, 5, 6 et 7) ; tous les échantillons de vin rouge avaient subi la fermentation malolactique en février 1963 à l'inverse des échantillons correspondants de vin rosé.

TABLEAU 2

		Moûts (21-9-62)		Vins rosés (9-10-62)				
		Degré réfractométrique	Acidité totale	Densité	Acidité totale	Acidité volatile	Degré alcoolique	Sucres (g/l.)
44-53	bloc 1	12°60	4,40	992,4	5,30	0,29	12°96	1,20
	bloc 2	12°95	4,50	992,0	5,30	0,21	13°30	1,36
	bloc 3	12°35	4,10	992,5	4,90	0,39	12°60	1,20
Rup. Lot	bloc 1	13°25	3,90	991,4	4,90	0,17	13°74	1,36
	bloc 2	12°45	3,90	991,7	4,70	0,21	12°86	1,10
	bloc 3	12°80	3,70	991,5	4,60	0,20	13°14	1,07
161-49	bloc 1	12°05	4,50	993,4	5,60	0,29	12°42	1,36
	bloc 2	12°55	4,40	992,3	5,40	0,22	12°80	1,30
	bloc 3	12°40	4,40	992,8	5,40	0,22	12°32	1,00
5 BB	bloc 1	12°05	4,60	993,2	5,40	0,27	12°32	1,24
	bloc 2	11°90	4,70	993,4	5,70	0,24	12°16	1,30
	bloc 3	11°90	4,35	993,6	5,20	0,32	12°12	1,27
P 1103	bloc 1	12°25	4,00	992,6	5,20	0,18	12°66	1,13
	bloc 2	12°80	3,90	991,9	5,10	0,15	13°14	1,23
	bloc 3	12°20	3,95	992,4	4,70	0,23	12°76	1,23
R 99	bloc 1	11°60	4,25	993,4	5,40	0,21	12°02	1,07
	bloc 2	12°35	4,05	992,4	5,10	0,17	12°80	0,94
	bloc 3	11°30	4,00	992,8	5,00	0,26	11°82	1,03
R 140	bloc 2	11°95	3,85	992,4	4,80	0,17	12°36	1,00
	bloc 3	12°70	4,10	991,7	5,10	0,22	13°14	1,24
R 110	bloc 2	12°25	4,10	992,3	5,10	0,18	12°76	1,49
	bloc 3	12°80	4,10	991,6	5,10	0,23	13°20	1,24
V 15	bloc 1	12°45	4,25	992,7	5,30	0,26	12°70	1,71

Avec le nombre limité d'échantillons d'un même porte-greffe que nous avons, il nous a paru difficile d'effectuer une étude statistique sur la validité des différences analytiques enregistrées.

Aussi, compte tenu de la précision de chacun des dosages, nous avons considéré comme significatives les différences analytiques entre porte-greffes nettement supérieures à celles relevées pour un même porte-greffe.

TABLEAU 3

		Vins rouges (11-10-62)				
		Densité	Acidité totale	Acidité volatile	Degré alcoolique	Sucres g/l.
44-53	bloc 1	997,2	3,40	0,30	12°88	2,09
	bloc 2	998,8	3,30	0,23	12°58	1,77
	bloc 3	997,6	3,40	0,27	12°58	2,00
Rup. Lot	bloc 1	999,5	3,30	0,34	13°08	1,95
	bloc 2	999,8	3,30	0,37	12°10	1,80
	bloc 3	998,3	3,00	0,34	12°64	1,95
161-49	bloc 1	997,5	3,90	0,30	12°40	1,95
	bloc 2	998,0	3,10	0,21	12°40	1,95
	bloc 3	997,0	3,30	0,31	12°40	2,05
5BB	bloc 1	997,4	3,50	0,28	12°68	2,07
	bloc 2	998,7	3,90	0,31	12°10	1,69
	bloc 3	998,5	4,00	0,24	12°64	1,95
P 1103	bloc 1	997,6	3,40	0,32	12°24	2,07
	bloc 2	999,5	3,10	0,20	11°96	1,92
	bloc 3	997,8	3,60	0,30	12°84	2,00
R 99	bloc 1	998,4	3,40	0,22	11°66	1,88
	bloc 2	998,8	3,20	0,20	12°04	2,11
	bloc 3	996,4	3,20	0,18	12°20	1,77
R 140	bloc 2	997,3	3,30	0,34	12°40	1,80
	bloc 3	998,6	3,30	0,22	12°50	1,95
R 110	bloc 2	997,3	3,50	0,22	12°98	2,00
	bloc 3	996,3	3,40	0,23	13°58	2,03
V 15	bloc 1	996,5	3,30	0,30	12°88	2,13

IV. — DISCUSSION

Il faut souligner le fait qu'il s'agit d'une vigne jeune, ce qui explique le degré alcoolique relativement faible et l'acidité totale assez importante du moût pour un cépage *Grenache noir*.

D'autre part, si les raisins ramassés ne présentaient pas à première vue de différences de maturité, il se peut cependant que la récolte effectuée le même jour pour tous les échantillons ne corresponde pas au stade optimum de cueillette pour tous les porte-greffes.

Ces remarques préliminaires faites, on peut noter sur les moûts analysés que le 5BB et le R99 semblent donner des jus d'acidité totale plus élevée (surtout le 5BB)

TABLEAU 4

Vins rosés

Échantillons		Acidité totale	Acidité volatile	pH	Cendres (g/l)	Alcalinité des cendres	K (meq/l)	Mg (meq/l)	Ca (meq/l)	Na (meq/l)
44-53	bloc 1	4,80	0,27	3,15	1,405	19	14,5	5,6	3,4	1,6
	bloc 2	5,00	0,22	3,15	1,425	19	14,5	5,9	3,2	1,6
	bloc 3	4,60	0,37	3,16	1,365	18,25	14,5	5,1	2,5	1,6
Rup. Lot	bloc 1	4,80	0,20	3,20	1,490	18,75	15,0	5,9	2,7	1,6
	bloc 2	4,50	0,20	3,19	1,475	18,50	14,5	5,6	2,7	1,4
	bloc 3	4,35	0,22	3,21	1,525	17,75	14,5	5,4	2,9	2,0
161-49	bloc 1	5,05	0,26	3,09	1,275	17,50	12,5	5,6	2,7	1,6
	bloc 2	4,85	0,23	3,15	1,410	18,20	13,5	6,2	2,6	1,4
	bloc 3	5,05	0,15	3,11	1,400	18,45	14,0	5,6	2,4	1,4
5 BB	bloc 1	5,15	0,28	3,10	1,310	17,10	12,5	5,0	2,4	1,6
	bloc 2	5,30	0,26	3,09	1,420	18,50	13,5	5,8	3,9	1,6
	bloc 3	4,95	0,32	3,12	1,380	17,50	13,0	5,5	3,9	1,6
P 1103	bloc 1	4,70	0,22	3,14	1,175	15,20	13,5	6,2	3,0	1,4
	bloc 2	4,80	0,22	3,15	1,335	17,40	14,0	6,7	3,4	1,4
	bloc 3	4,55	0,25	3,15	1,300	16,30	13,5	5,9	3,0	1,4
R 99	bloc 1	4,95	0,27	3,05	1,560	20,96	14,0	6,7	4,2	1,4
	bloc 2	4,50	0,20	3,15	1,495	19,21	14,0	6,7	3,5	1,4
	bloc 3	4,50	0,30	3,10	1,425	19,15	13,5	5,9	3,4	1,6
R 140	bloc 2	4,50	0,22	3,19	1,365	18,40	13,0	5,9	3,0	1,3
	bloc 3	4,75	0,27	3,20	1,420	19,70	15,0	5,6	3,8	1,4
R 110	bloc 2	4,40	0,21	3,22	1,500	20,00	15,0	6,1	3,2	1,3
	bloc 3	4,80	0,23	3,20	1,435	18,40	13,5	5,5	3,7	1,4
V 15	bloc 1	5,0	0,29	3,15	1,545	20,30	15,5	6,0	3,8	1,3

et de degré alcoolique un peu plus faible que la moyenne des résultats ; le 44-53 donne un degré alcoolique et une acidité totale élevés, de même que le 161-49, mais celui-ci d'une façon plus nuancée ; tandis que le moût de *Grenache* greffé sur *Rupestris du Lot* présente un degré probable plus élevé et une acidité totale plus basse.

Sur les échantillons de vins rouges, on peut faire une remarque générale sur la faiblesse de l'acidité totale et les chiffres très élevés corrélatifs pour le pH.

On remarque aussi que les vins sont riches en potassium et en phosphates et

on peut supposer que la terre est bien pourvue en ces éléments sous une forme facilement échangeable.

On note des différences significatives sur les porte-greffes 161-49 et 5BB qui donnent des vins rouges moins riches en cendres, en alcalinité des cendres et en potassium ; en outre, celui de 5BB contient moins de calcium. Par contre, ces deux échantillons de vins rouges se différencient par une dose plus élevée de fer.

TABEAU 5

Vins rosés

Échantillons		PO ₄ (meq/l)	SO ₄ (meq/l)	Cl (meq/l)	Fe (meq/l)	Cu (mmg/l)	Mn (mmg)
44-53	bloc 1	3,6	2,0	0,4	7,0	0,25	0,30
	bloc 2	4,8	2,2	0,4	7,2	0,25	0,30
	bloc 3	5,3	2,2	0,4	6,2	0,20	0,30
Rup. Lot	bloc 1	5,6	1,7	0,4	7,5	0,25	0,30
	bloc 2	4,8	2,3	0,4	8,0	0,10	0,40
	bloc 3	6,7	2,1	0,4	7,0	0,20	0,25
161-49	bloc 1	3,9	1,7	0,4	5,0	0,50	0,25
	bloc 2	5,1	1,2	0,4	10,0	0,25	0,30
	bloc 3	5,0	2,1	0,4	6,6	0,25	0,80
5 BB	bloc 1	5,4	1,7	0,6	9,0	0,40	0,75
	bloc 2	5,5	1,9	0,6	7,6	0,30	0,55
	bloc 3	5,2	1,4	0,6	6,4	0,20	0,70
P 1103	bloc 1	4,8	1,4	0,3	7,0	0,20	0,45
	bloc 2	5,6	1,6	0,4	5,2	0,30	0,65
	bloc 3	6,8	1,5	0,6	6,8	0,20	0,40
R 99	bloc 1	4,3	1,7	0,3	7,6	0,40	0,20
	bloc 2	4,9	1,9	0,3	7,5	0,25	0,70
	bloc 3	4,4	1,8	0,4	4,4	0,25	0,75
R 140	bloc 2	5,3	1,3	0,3	7,0	0,10	0,75
	bloc 3	5,0	1,6	0,3	5,3	0,35	0,20
R 110	bloc 2	5,1	1,5	0,2	4,6	0,25	0,80
	bloc 3	4,4	1,7	0,3	7,4	0,20	0,30
V 15	bloc 1	4,6	1,7	0,3	6,4	0,40	0,65

Nous pouvons ici ouvrir une parenthèse pour souligner, comme cela l'a été maintes fois démontré, que d'une manière très générale, les doses de fer présentes naturellement dans le raisin sont suffisamment faibles pour éviter tout traitement de déferrisation ultérieur. Il faut simplement éviter un enrichissement excessif en fer pendant la vendange et la vinification en choisissant du matériel bien adapté.

Sur les échantillons de vins rosés, on retrouve les observations faites sur les vins rouges mais les différences analytiques sont moindres et ne sont plus significatives. Cette atténuation des différences peut être due à l'échantillonnage ou à l'absence de la rafle.

Cependant les différences analytiques enregistrées du point de vue minéral restent faibles : les porte-greffes *161-49* et *5BB*, issus de croisement *Riparia* × *Berlandieri* semblent différer légèrement des autres porte-greffes étudiés qui ont tous du *Rupestris* dans leur origine.

Ces porte-greffes ont certainement des caractères trop voisins pour donner des résultats très différents au point de vue composition minérale du moût. Placés dans

TABLEAU 6

Vins rouges

Échantillons		Acidité totale	Acidité volatile	pH	Cendres (g/l)	Alcalinité des cendres	K (meq/l)	Mg (meq/l)	Ca (meq/l)	Na (meq/l)
44-53	bloc 1	2,30	0,32	4,16	2,825	30,35	32	7,60	2,90	1,6
	bloc 2	2,50	0,36	4,04	2,800	30,00	30	6,60	3,40	1,6
	bloc 3	2,40	0,39	4,25	2,920	30,50	31,5	6,40	2,90	1,5
Rup. Lot	bloc 1	2,35	0,43	4,22	2,940	32,31	32,5	7,10	2,7	1,6
	bloc 2	2,70	0,53	4,09	2,990	33,00	33	7,10	2,7	1,6
	bloc 3	2,30	0,40	4,13	2,965	32,25	33	6,69	2,7	1,5
161-49	bloc 1	2,93	0,39	3,62	2,260	25,94	23,5	8,40	2,7	1,7
	bloc 2	2,18	0,28	3,94	2,540	27,87	28,0	7,40	2,6	1,4
	bloc 3	2,35	0,40	3,90	2,575	27,50	28,0	8,20	2,7	1,4
5 BB	bloc 1	2,57	0,31	3,80	2,250	25,44	25,0	7,50	1,4	1,5
	bloc 2	3,15	0,32	3,56	2,245	23,94	23,5	7,00	1,6	1,5
	bloc 3	2,56	0,37	3,83	2,390	26,00	24,5	6,90	1,4	1,5
P 1103	bloc 1	2,35	0,47	4,10	2,850	29,25	30,5	8,60	2,1	1,6
	bloc 2	2,30	0,25	4,06	3,010	31,75	33,5	8,00	1,9	1,6
	bloc 3	2,27	0,41	4,16	2,950	29,94	31,5	8,60	2,9	1,6
R 99	bloc 1	2,73	0,27	3,82	2,625	27,15	30,0	7,80	3,1	1,6
	bloc 2	2,40	0,25	3,97	3,100	30,40	33,5	9,70	2,3	1,6
	bloc 3	1,98	0,27	4,09	2,725	28,18	31,5	8,2	2,7	1,6
R 140	bloc 2	2,23	0,32	4,02	2,650	27,12	30,0	6,1	2,9	1,8
	bloc 3	2,27	0,32	3,98	2,800	28,75	30,5	5,3	2,8	1,8
R 110	bloc 2	2,05	0,45	4,20	2,875	29,12	33,0	6,4	2,4	1,8
	bloc 3	2,37	0,32	4,00	2,700	26,75	33,0	5,4	2,9	1,7
V 15	bloc 1	2,65	0,37	3,82	2,500	29,75	33,0	5,2	3,3	1,8

des situations géographiques particulières, des caractères spécifiques pourraient peut-être mieux se dessiner.

Il sera intéressant de poursuivre les essais sur cette parcelle durant quelques années pour éliminer les risques d'erreur due à un développement végétatif plus ou moins rapide.

Il sera intéressant également d'effectuer les analyses à plusieurs reprises en suivant la maturation des grains ; en effet, comme cela a déjà été souligné plus haut,

la récolte de toutes les souches a été faite au même moment à des stades de maturité peut-être différents, et l'on sait que la composition minérale des moûts varie, pour certains cations, d'une manière très sensible avec l'époque de la récolte.

TABLEAU 7

Vins rouges

Échantillons		PO ₄ (meq/l)	SO ₄ (meq/l)	Cl (meq/l)	Fe (mmg/l)	Cu (mmg/l)	Mn (mmg/l)
44-53	bloc 1	10,12	3,70	0,9	3,4	0,70	0,25
	bloc 2	11,06	3,80	1,0	4,8	0,10	0,25
	bloc 3	12,37	4,80	0,9	4,8	0,70	0,20
<i>Rup. Lot</i>	bloc 1	13,50	3,60	0,60	3,5	0,25	0,20
	bloc 2	13,50	3,50	0,5	4,1	0,25	0,20
	bloc 3	13,50	3,80	0,5	4,0	0,60	0,22
161-49	bloc 1	7,13	3,2	0,7	12,6	0,20	0,70
	bloc 2	10,01	3,0	0,5	7,8	0,40	0,25
	bloc 3	10,69	3,8	0,4	7,6	0,25	0,35
5 BB	bloc 1	12,67	4,1	0,5	6,3	0,85	0,70
	bloc 2	12,19	3,3	0,5	4,6	0,45	0,65
	bloc 3	14,81	3,5	0,7	7,2	0,55	0,75
P 1103	bloc 1	15,00	4,0	0,8	4,2	0,40	0,25
	bloc 2	15,00	3,85	0,9	4,8	0,10	0,45
	bloc 3	14,60	4,5	0,8	3,8	0,35	0,50
R 99	bloc 1	10,10	3,95	0,8	4,2	0,40	0,75
	bloc 2	11,90	4,3	0,9	2,8	0,85	0,55
	bloc 3	9,80	5,3	1,0	3,2	0,30	0,50
R 140	bloc 2	12,50	4,0	0,8	3,8	0,35	0,60
	bloc 3	13,50	4,3	0,8	3,8	0,35	0,55
R 110	bloc 2	15,00	4,6	0,6	3,8	0,70	0,40
	bloc 3	12,00	4,4	0,6	4,5	0,70	0,40
V 15	bloc 1	10,50	3,7	0,8	4,8	1,00	0,45

V. — CONCLUSION

Dans nos conditions expérimentales, les porte-greffes étudiés amènent peu de différences significatives sur la composition minérale du vin du *Vinifera* greffé.

Cependant, les deux porte-greffes issus de *Riparia*, le *Couderc* 161-49 et le 5BB *Teléki* se distinguent des autres porte-greffes *Rupestris* ou issus de *Rupestris*. Ils semblent absorber moins de potassium (et moins de calcium pour le 5BB) et plus de fer.

D'autres facteurs, climat, sol, engrais, doivent influencer plus fortement, qualitativement et quantitativement, sur les ions minéraux.

Ces essais doivent être poursuivis pour préciser et confirmer ces premières observations.

Reçu pour publication en juillet 1963.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF STOCKS ON THE MINERAL COMPOSITION OF WINES

The possible influence of the stock on the mineral composition of wine from the same variety of *vinifera* was investigated. Nine stocks : *Rupestris du Lot*, 41 B, R 140, R 99, R 110, 161-49 C, 44-53 M, P 1103, 5 BB *Teleki*, and *Vivet 15*, from the same plot of *Grenache noir* were studied. Analytical differences were few and not particularly significant, except for the red wines ; two of the stocks tested, 161-49 C, and 5 BB, both the issue of a cross *Berlandieri* × *Riparia*, seemed to vary from the other stocks issuing from *Rupestris* : their red wines were poorer in ash, in alkalinity of the ash and in potassium (5 BB also had less calcium), and richer in iron than the red wines corresponding to the other stocks.

Other factors such as climate, soil, fertiliser, must influence the mineral elements more strongly, both qualitatively and quantitatively.

These experiments will be followed up in order to obtain a more precise picture in respect of the latter remarks.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLANC-AICARD D., 1955. Études préliminaires sur l'adsorption radicaire des cations. *Ann. agron.*, 615-633.
- BLANC-AICARD D., DROUINEAU G., 1955. Capacité de saturation en Ca des porte-greffes de vigne et résistance à la chlorose calcaire. *C. R. Ac. Agr.*, 241.
- BONASTRE J., 1959. Contribution à l'étude des matières minérales dans les produits végétaux. Application au vin. *Ann. Technol. agric.*, 377-446.
- BOUZIGUES L., BOUZIGUES H., 1956. Dosage électrophotométrique des traces de manganèse dans les moûts et les vins. *Ann. Technol. agric.*, 429-439.
- DEIBNER L., BOUZIGUES H., 1952. Dosage électrophotométrique de traces de fer dans les vins à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Technol. agric.*, 283-309.
- FLANZY M., 1947. Le potassium dans le cep de vigne. *Ann. agron.*, 17, 545-563.
- FLANZY M., LAMAZOU-BETBEDER M., 1944. La potasse et l'indice de tartre dans les vins 1943. *C. R. Ac. Agric.*, 30, 208.
- FLANZY M., 1946. L'indice de tartre dans les vins. Signification météorique. *Ann. agron.*, 16, 341.
- JAULMES P., 1951. *Analyse des vins*. Libr. Poulain, Montpellier.
- JOURET C., 1951. Étude d'une technique de dosage du sodium dans les vins et les moûts par spectrophotométrie de flamme. *Ann. Technol. agric.*, 10, 361-368.
- JOURET C., POUX C., 1961. Étude d'une technique de dosage de potassium par spectrophotométrie de flamme dans les vins et les moûts. *Ann. Technol. agric.*, 10, 351-359.
- PEYNAUD E., 1946. Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition du vin. *Thèse, Bordeaux*.
- PUISSANT A., 1960. Étude sur la variation de la teneur en NH₄, K, Ca, Mg, de quelques raisins en cours de maturation. *Ann. Technol. agric.*, 9, 321-330.
- RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins*. Libr. C. Béranger, Paris.

SUR L'EXTRACTION DES COMPOSÉS POLYPHÉNOLIQUES COLORÉS DES VINS ROUGES A L'AIDE DE L'ACÉTATE DE PLOMB

L. DEIBNER et M. BOURZEIX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

La réaction entre les acétates de plomb, neutre et basique, et les substances polyphénoliques colorées d'origine végétale, avec formation de sels insolubles, constitue de longue date un moyen commode pour extraire ces substances des liquides complexes tels que les vins rouges, par exemple.

En raison de la modicité des renseignements actuellement existants, il a fallu entreprendre des études, basées sur l'utilisation de la chromatographie de partage sur papier, pour parvenir à une meilleure connaissance des particularités de la séparation des anthocyanes du vin à l'aide de l'acétate basique de plomb commercial et également pour mettre en évidence les conséquences de ce mode d'extraction sur l'intégrité chimique des substances colorantes en fonction de différents facteurs du milieu.

I — INTRODUCTION

A notre connaissance, l'emploi des sels de plomb, comme réactif précipitant des substances polyphénoliques colorées d'origine végétale, remonte aux travaux de BRACONNOT (1807) qui a fait appel au nitrate plombique pour isoler les colorants des baies de *Phytolacca* (raisin d'Amérique).

C'est seulement quelques années plus tard que CHEVALLIER (1827) a utilisé, à côté d'autres réactifs, l'acétate et le sous-acétate de plomb pour l'extraction des colorants des vins rouges. Par la suite ces derniers sont séparés tantôt par l'acétate (MULDER, 1856), tantôt par le sous-acétate de plomb (GLÉNARD, 1858; GAUTIER, 1878). Fait important, MULDER (1856) a constaté que le liquide traité devient d'autant plus incolore qu'il est plus neutre. C'est ainsi que TANRET (1894) obtient une meilleure extraction de la picéine à l'aide de l'acétate de plomb en milieu ammoniacal. Le rôle du pH est important pendant la précipitation des substances polyphénoliques au moyen de sels de plomb. D'ailleurs, l'acétate de plomb est considéré comme plus

sélectif que le sous-acétate. Dans ces conditions, le premier est utilisé comme agent clarifiant, tandis que le deuxième agit comme précipitant (GEISSMAN, 1955).

D'une façon générale, l'acétate de plomb neutre forme des précipités avec les composés contenant des dihydroxygroupes en orthoposition. De nos jours il est souvent employé pour l'extraction et la concentration des anthocyanes (HAYASHI, NOGUCHI, ABE, 1954; REICHEL, STROH, REICHWALD, 1957; CHANDLER, 1958).

D'après ONSLOW (1925) l'utilisation des sels de plomb présente les mêmes inconvénients que les alcalis qui peuvent occasionner la destruction des composés colorés soit en raison de l'excès du réactifs alcalin utilisé, soit en fonction de la durée de la réaction (WILLSTÄTTER, EVEREST, 1913).

De plus, l'acétate neutre de plomb précipite également les substances polyphénoliques du type des tannins hydrolysables (pyrogalliques) et condensés (catéchiques). Toutefois, la présence d'une certaine quantité d'acide acétique en excès empêche la précipitation des tannins catéchiques alors que les tannins pyrogalliques sont totalement ou partiellement précipités (MEUNIER, 1953; BUCHANAN, LEWIS, WEBER, 1950). D'ailleurs WILLSTÄTTER et ZOLLINGER (1915-1916) ont constaté que l'acétate de plomb ne permet pas une séparation convenable des anthocyanes. Signalons en passant que MANCEAU (1897) a étudié l'action des sels métalliques sur les tannins pyrogalliques. Quant à l'œnotannin, il est également précipité par l'acétate de plomb (GAUTIER, 1877; PETRI, 1903).

Comme pour les substances polyphénoliques colorées, le pH de précipitation joue un rôle important sur l'intégrité chimique des tannins. En effet, en milieu alcalin leur oxydation est plus rapide et plus profonde (CLARENS, 1921). D'après WHITE (1956), au-dessus du pH 8, les modifications des structures chimiques des tannins sont telles qu'on ne peut plus parler de tannins.

Enfin l'acétate de plomb fait précipiter totalement ou partiellement les acides organiques. Par contre, les sucres ne sont pas touchés.

Malgré ces inconvénients, l'acétate de plomb a continué à être employé pour l'extraction des colorants des vins et des jus de raisin. C'est ainsi que NÈGRE (1942, 1945) élimine les substances polyphénoliques du vin à l'aide d'une solution saturée d'acétate neutre de plomb ajoutée en excès au vin préalablement rendu nettement alcalin. Par contre, DOURMISCHIDZÉ (1948) précipite les composés colorés en solution aqueuse par l'acétate basique de plomb après l'élimination des pectines, de la chlorophylle et d'autres substances gênantes. Si, après un repos d'une demi-heure et centrifugation, la solution n'est pas décolorée, même après l'addition d'une quantité supplémentaire d'acétate de plomb basique, on la chauffe au bain-marie. Cette technique a été exposée dans notre publication parue en 1952 (DEIBNER). Pour précipiter les substances tanniques du jus de raisin SASTRY et TISCHER (1952) utilisent la technique de JOHNSON, FOREMAN et MAYER (1950), qui fait appel à l'acétate neutre de plomb réagissant en milieu alcoolique. Cette technique ne permet pas, d'après nos essais, d'obtenir la séparation des substances tanniques et colorées, ces dernières étant précipitées en partie. BOCKIAN, KEPNER et WEBB (1955) effectuent la purification des substances colorées, extraites des pellicules des baies de raisin par l'acide chlorhydrique dissous dans le méthanol, à l'aide de l'acétate de plomb neutre. Dans ce cas la précipitation des ces substances n'est pas complète, la solution surnageante étant de couleur bleue. AMIEL, DUPUY, NORTZ (1955) effectuent la précipitation des colorants rouges du raisin à l'aide de l'acétate neutre de plomb en présence de l'ammo-

niaque ajoutée en quantité nécessaire pour avoir toujours le pH égal à 9. Cette technique a été employée pour les vins par COUX, VITTE (1960). DRAWERT (1960, 1961) précipite les constituants colorés des vins et des jus de raisin rouges neutralisés à pH 7,2 avec la solution 2 N d'hydroxyde de sodium. Le volume d'acétate de plomb utilisé est double de celui du vin. Le pH final de la solution obtenue est de l'ordre de 8,3. L'auteur a remarqué que le liquide centrifugé est incolore, mais rougit légèrement après acidification, ce qui montre l'existence des substances colorées difficiles à précipiter. En outre, DRAWERT précise qu'il est possible d'obtenir les précipitations fractionnées des substances colorées rouges du moût de raisin. KAIN (1961) emploie l'acétate basique de plomb de densité 1,23-1,24 pour la précipitation fractionnée des substances colorées du vin rouge, préalablement neutralisé par une solution d'hydroxyde de potassium N/3. En ajoutant à 20 ml de vin neutralisé 1,5 ml d'acétate de plomb, KAIN sépare d'abord les anthocyanes monoglucosidiques. Après la séparation du précipité, il ajoute au liquide 1 ml d'acétate ce qui permet de précipiter les diglucosides. Cette technique reconnaît un fait important : la précipitation moins aisée des diglucosides par l'acétate basique de plomb qui cependant peut être facilitée par dilution convenable du vin. SENGEWALD (1961) propose l'emploi d'une solution à 15 p. 100 d'acétate neutre de plomb et d'une solution concentrée d'ammoniaque, utilisées successivement. Le premier réactif donne un précipité dépourvu du malvoside tandis que le précipité ammoniacal contient la presque totalité de ce diglucoside. En effet, les essais effectués montrent que 92,5 p. 100 des anthocyanes des vins rouges hybrides sont précipités dans ce milieu ammoniacal, le précipité obtenu contenant 70 à 80 p. 100 de malvoside. La méthode allemande officielle (1961) s'inspire de ce mode opératoire. Elle a recours à une solution à 10 p. 100 d'acétate de plomb neutre pour éliminer un certain nombre de substances, les composés indésirables compris. Le liquide surnageant et les eaux de lavage du précipité, réunis après centrifugation, sont alors additionnés d'ammoniaque jusqu'à provoquer la précipitation des diglucosides. Comme on le voit, le procédé allemand reconnaît implicitement la difficulté relative de la précipitation des anthocyanes diglucosidiques. RENTSCHLER, TANNER et BRUNNER (1961) utilisent cette technique avec quelques modifications opératoires. Tout récemment CHANDLER et HARPER (1962) ont décrit le procédé d'extraction des colorants rouges du cassis, à partir de leurs solutions dans le mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique, à l'aide d'une solution aqueuse, saturée d'acétate de plomb. D'après HAYASHI (1962), l'acétate basique de plomb commercial conduit à un meilleur résultat que l'acétate neutre et que les acétates basiques de préparation. La présence d'hydroxyle en orthoposition est favorable à la formation des sels de plomb des anthocyanes. C'est ainsi que les glucosides du cyanidol et du delphinidol sont précipités quantitativement tandis que les mêmes dérivés du pelargonidol, du paéonidol et du malvidol ne sont précipités qu'en partie.

D'après TANNER, RENTSCHLER et SENN (1963), l'acétate de plomb précipite à pH 3 les polyphénols, à pH 5 les monoglucosides et à pH 7-8,1 les diglucosides. La précipitation de ces derniers serait complète à pH 8,1 mais leurs traces se trouvent mélangées aux monoglucosides précipités à pH 5,0. D'ailleurs, ces séparations n'ont pas un caractère rigoureux.

Tout récemment BIOL et FOULONNEAU (1963) ont effectué une étude comparative de décoloration des vins au moyen des sels de métaux lourds (mercure, plomb,

zinc), suivant les différentes techniques. Entre autres, ils ont constaté que les monoglucosides sont plus facilement précipitables que le malvoside, quel que soit le réactif.

Il existe, tout au moins à notre connaissance, peu de données exactes sur l'altération des anthocyanes des vins rouges en milieu alcalin. Cette altération a été évoquée par BERGERET (1961). SENGEWALD (1961) signale qu'en solution acide (pH 4,2) et en présence d'ammoniaque (pH 6,7) l'acétate de plomb provoque une certaine décomposition de substances colorées des vins.

II — RECHERCHES PERSONNELLES

A — ORIGINE DES TRAVAUX

La détection des anthocyanes diglucosides dans les vins pose des problèmes analytiques particuliers dans les cas où les composés colorés se trouvent en petite quantité, à côté d'autres colorants dont la concentration est plus élevée, surtout en présence de glucides, composants naturels des vins doux ou des jus de raisin.

Au cours de nos recherches consacrées à l'élaboration d'un mode opératoire permettant de déceler les quantités de diglucosides de l'ordre de 0,10-0,25 p. 100 dans les vins secs ou sucrés et dans les jus de raisin, nous avons fait appel à l'acétate basique de plomb pour extraire et pour concentrer les substances colorantes qui nous intéressaient, sans que le pH du milieu dépasse 6,8-7,0. On sait qu'à pH 7 et au-delà les modifications des substances polyphénoliques deviennent sensibles (SCHANDLER, 1962). D'ailleurs les résultats complets obtenus seront exposés dans un mémoire à paraître (DEIBNER-BOURZEIX). En attendant sa publication, nous indiquerons les grandes lignes de notre technique. Tout d'abord elle est basée sur la précipitation des substances colorées et d'autres composés par l'acétate de plomb basique de densité 1,32 ajouté à raison de 3 ml pour 10 ml de vin et sur leur déplacement du précipité par 1 ml d'acide chlorhydrique à 4 p. 100 dans le méthanol. Ajoutons que la durée de précipitation est de 15 minutes. La séparation s'effectue par centrifugation pendant 15 minutes à 5 000 tours minute.

La solution des substances colorées est ensuite soumise à l'analyse chromatographique. A cet effet on utilise la chromatographie simplifiée ascendante bidimensionnelle exécutée à l'aide du solvant de BRITTON-ROBINSON, préconisé par P. RIBÉREAU-GAYON (1953, 1956), sur papier Arches 302 découpé en carrés de 18 cm. Nous signalons brièvement que, contrairement à l'opinion existante, le papier Arches 302 possède une direction privilégiée correspondant à la largeur des feuilles commerciales (56 × 54). Le premier développement d'une tache de départ circulaire placée dans l'angle du bas à gauche à 3 cm du bord gauche et à 3 cm également du bord inférieur s'effectue dans le sens de la largeur de la feuille initiale, c'est-à-dire dans la direction privilégiée. Deux témoins de malvoside (Société FLUKA), dissous dans le mélange d'acide chlorhydrique concentré (10 v) et de méthanol (270 v) à raison de 200 mg par litre, sont déposés sur les chromatogrammes aux emplacements disposés en haut et à droite de la tache de départ à 0,5 cm des bords opposés de la feuille.

Le témoin de droite sert pour le premier développement, l'autre pour le deuxième développement, la feuille étant tournée de 90°. dans le sens contraire à celui de la

rotation des aiguilles d'une montre. Ce mode opératoire permet de faire sortir la tache des diglucosides, laquelle se place sur la diagonale du carré de papier à l'intersection des droites passant par les deux taches-témoins de malvoside et respectivement parallèles aux sens du développement.

Dans ces conditions l'observation de la fluorescence rose devient plus aisée et plus sûre. En même temps la détection de la quantité des diglucosides de l'ordre de 0,1 p. 100 exprimée en hybride, *Seyve-Villard* 18315 par exemple, devient possible.

Au cours des nombreux essais effectués, nous avons noté l'absence systématique d'équivalence entre les intensités des fluorescences roses des taches obtenues directement à partir d'un mélange contenant 1 p. 100 d'hybride et celles obtenues par un mélange contenant 0,1 p. 100 d'hybride, dont les colorants, après leur précipitation par l'acétate basique de plomb, sont repris par un volume de solvant 10 fois plus faible que celui utilisé. Cette dernière opération revient pourtant à concentrer 10 fois et doit théoriquement permettre d'obtenir une fluorescence rose de même intensité que celle produite directement par le premier mélange à 1 p. 100 d'hybride.

Le déficit est de l'ordre de 10-20 p. 100. Il ne peut provenir d'éventuelles pertes dues aux manipulations car toutes les opérations — précipitation, centrifugation, reprise du précipité — sont faites dans le même godet. Ce mode opératoire est jugé préférable à la filtration au moyen d'un entonnoir de BUCHNER muni de deux filtres en papier, superposés (ruban bleu DURIEUX).

Les pertes constatées peuvent s'expliquer soit par la destruction des diglucosides, soit par l'insuffisance de leur précipitation par l'acétate basique de plomb. On a donc procédé aux essais comparatifs avec trois produits, à savoir le malvoside commercial (Sté FLUKA, Suisse), le paéonoside, préparé par nous à partir de pétales de pivoine rouge et l'œnoside, extrait des pellicules de raisin de *Carignan* sous forme de picrate.

B — EXPOSÉ DES TRAVAUX

L'extraction des composés polyphénoliques colorés du vin par une solution aqueuse d'acétate basique de plomb constitue un moyen commode de rendre la détection des anthocyanes diglucosides plus efficace. Or, il est naturel de se demander si la réaction entre l'acétate de plomb et ces composés est complète pour chaque composant coloré et si, en outre, elle n'est pas accompagnée d'autres réactions responsables de leurs modifications chimiques, tout au moins pour certains d'entre eux.

Les recherches entreprises avaient pour but de répondre à ces questions importantes. Tout d'abord on a comparé les comportements du malvoside commercial, du paeonoside et du picrate d'œnoside, ces deux derniers colorants, plus ou moins impurs, étant préparés dans notre laboratoire ; ensuite l'action de l'acétate de plomb sur les colorants des vins *Vitis vinifera* et hybrides a fait l'objet d'études exécutées dans différentes conditions. Enfin l'efficacité des quelques procédés d'élimination des colorants rouges a été vérifiée.

Notre exposé débutera par la présentation des résultats obtenus à la suite des essais effectués avec le malvoside commercial.

1°). — SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

a) *Malvoside commercial (chlorure)*

Le chlorure de malvoside pur, fourni par la Société FLUKA (BUCHS, Suisse) est livré comme substance étalon pour l'identification des jus de raisin et des vins rouges hybrides.

L'examen chromatographique de cette substance, reçue dernièrement, suivant la technique descendante de BATE-SMITH et WESTALL (1950), utilisant le papier Whatman n° 1 et le mélange butanol-acide actique-eau en proportion 4 : 1 : 5, a montré que sa pureté est supérieure à celle des produits livrés précédemment. Néanmoins cette substance contient en petite quantité deux colorants étrangers, l'un donne une tache de R_f 0,37 ; il s'agit sans doute de l'œnoside se formant par l'hydrolyse du malvoside lors de sa dissolution. L'autre produit une tache de R_f 0,16 et n'est pas identifié. Le malvoside est dissous, à raison de 400 mg par litre, dans un mélange hydroalcoolique contenant 10° G.L. d'alcool, 2 g d'acide tartrique et 2 g de tartrate acide de potassium par litre. Le pH apparent est de 3 en raison de la présence d'éthanol. Le pH pondéral, défini par LEVASSEUR (1949) (voir également DÉRIBÉRE, 1950, VALLET, 1951, CABANNES, 1953) peut se calculer d'après la formule

$$pH_p = pH - \frac{1}{2} \log \frac{55,5}{(H_2O)_x} \text{ où } (H_2O)_x \text{ est une concentration moléculaire.}$$

Les essais de précipitation du malvoside ont été effectués au moyen d'acétate de plomb pur (PROLABO R. P.) de densité 1,32 (PbO total 25 p. 100, PbO basique 10 p. 100), de manière à obtenir dans le liquide un pH final de l'ordre de 6,8-7,0. A cet effet 10 ml de solution acide de pH 3 reçoivent 3 ml de solution d'acétate. Après agitation et attente de 15 minutes on centrifuge durant 15 minutes à 5 000 tours/minute. Le précipité vert obtenu est repris par 10 ml de méthanol chlorhydrique à 4 p. 100 (méthanol 340 ml, acide chlorhydrique concentré, Dté 1,19-40 ml). Quant au liquide limpide et coloré en vert qui se trouve au-dessus du précipité, il est additionné de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré fumant, densité 1,19, de façon à atteindre un pH de 3 environ, déterminé à l'aide des papiers indicateurs spéciaux MERCK. La couche liquide, surnageant le précipité blanc de chlorure de plomb, est colorée en rose, ce qui indique que la précipitation du malvoside n'est pas complète. Les deux liquides colorés finaux obtenus sont soumis à la chromatographie descendante suivant la technique de BATE-SMITH et WESTALL (1950). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 1.

Tout d'abord nous remarquons que l'œnoside (R_f 0,36) possède une fluorescence rose en lumière de Wood. D'ailleurs POWERS et ses collaborateurs (1960) ont observé l'existence de cette fluorescence de l'œnoside isolé à partir d'un vin de *Pinot noir* et du raisin *Concord*, la chromatographie étant exécutée suivant la même technique que celle employée par nous.

Il ressort des résultats du tableau 1 que la précipitation du malvoside dans les conditions de nos essais n'est pas complète. Nous avons cherché à évaluer approximativement la partie du malvoside non précipité. L'expérience a été exécutée dans les mêmes conditions que précédemment.

Nous avons vérifié que l'addition de quelques gouttes de la solution d'acétate basique de plomb au liquide, surnageant le précipité formé, ne provoque aucune nouvelle précipitation. Ce fait montre que 3 ml d'acétate constituent une quantité suffisante pour une prise d'essai de 10 ml d'une solution de malvoside à 1000 mg par litre de mélange hydro-alcoolique synthétique. Le colorant du liquide surnageant séparé est régénéré par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré ; ensuite la solution est diluée avec du mélange synthétique jusqu'à 50 ml, le pH étant ramené à 1 par addition d'acide chlorhydrique. Le précipité est traité par quelques gouttes d'acide chlorhydrique ; le liquide surnageant coloré en rose est séparé du

TABLEAU I

Caractéristiques du chlorure de malvoside commercial.
Prises d'essai chromatographiques : 50 μ l

Témoin			Précipité			Liquide surnageant		
Rf	Aspect		Rf	Aspect		Rf	Aspect	
	Visible	UV		Visible	UV		Visible	UV
0,16	Rose		0,16	Rose		—	—	—
			0,19	Invisible	Fluor. bleue	—	—	—
0,27 (malvoside)	Rose	Fluor. rose	0,27	Rose	Fluor. rose	0,27	Rose Légère	Fluor. rose
0,36 (œnoside)	Rose	Fluor. rose	0,36	Rose	Fluor. rose	—	—	—

précipité blanc de chlorure de plomb par centrifugation. Il est ensuite dilué jusqu'à 50 ml avec le mélange synthétique et son pH est ramené à 1 avec l'acide chlorhydrique.

Une gamme de comparaison est composée des solutions de malvoside à 200, 160, 40 et 20 mg. par litre, dans le mélange synthétique, dont le pH est ramené à 1 par addition d'acide chlorhydrique.

La comparaison colorimétrique effectuée a montré que l'intensité de la teinte rose du liquide issu du liquide surnageant est comparable à celle de la solution à 20 mg de malvoside par litre.

La solution provenant du précipité est semblable au point de vue de sa teinte à la solution de malvoside à 180 mg par litre. Il ressort de ces résultats que 10 p. 100 du malvoside de la solution étudiée ne sont pas précipités par l'acétate basique de plomb dans le milieu de pH 6,8-7,0.

Remarquons que l'utilisation de la poudre de cellulose ou de nylon, introduite dans la solution de malvoside soit avant l'addition d'acétate de plomb, soit après,

dans les liquides surnageants séparés par centrifugation, n'a pas permis de rendre complète l'extraction du colorant, sauf si le pH des liquides est porté à 10.

Dans ces conditions nous étions amenés à effectuer la précipitation aux pH plus élevés, aux environs de 11. A cet effet une prise de 10 ml de solution de malvoside à 400 mg dans le mélange synthétique indiqué précédemment est additionnée de 1 ml d'ammoniaque à 28 p. 100 ($D_{15} = 0,900$). Après agitation, puis attente de 5 minutes, le malvoside est précipité par 3 ml d'acétate basique de plomb. La suite des opérations s'effectue suivant le mode opératoire indiqué précédemment. Les colorants précipités sont dissous dans 10 ml de solution d'acide chlorhydrique à 4 p. 100 dans le méthanol. Le liquide surnageant est acidifié avec de l'acide chlorhydrique concentré de façon à obtenir le pH 3.

Les résultats de l'étude chromatographique, effectuée selon la technique de BATE-SMITH et WESTALL (1950), sont consignés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Caractéristiques du chlorure de malvoside commercial.
Prises d'essai chromatographiques : 50 µl

Témoin			Précipité			Liquide surnageant		
Rf	Aspect		Rf	Aspect		Rf	Aspect	
	Visible	UV		Visible	UV		Visible	UV
0,16	Rose, légère tache	—	0,16	Rose, tache très légère	—	—	—	—
0,27 (malvoside)	Rose	Fluor. rose	0,27	Rose, légère moins intense	Fluor. rose	—	—	—
0,36	Rose	Fluor. rose	0,36	Rose, plus intense	Fluor. rose	—	—	—

L'intensité des taches des colorants du précipité indique que la tache de Rf 16 a pratiquement disparu et que la tache de Rf 0,27 est légèrement moins intense, ce qui montre qu'il y a eu hydrolyse très partielle du malvoside. En effet, la tache d'œnoside, Rf 0,36, quoique faible, paraît plus intense.

Cette circonstance ne nous permet pas de voir si l'œnoside subit ou non une modification en milieu ammoniacal sous l'action de l'acétate de plomb. Nous verrons par la suite que la stabilité de l'œnoside est bien moindre par rapport au malvoside précipité entièrement à pH 11, sans subir une modification chimique sensible. Dans ces conditions, on est tenté de supposer qu'il existe deux formes de malvoside bien diffé-

rentes par leur comportement vis-à-vis de l'acétate basique de plomb en milieu neutre et aux pH élevés. Il se peut que l'apparition d'une forme non précipitable soit due à l'action du réactif précipitant. En tout cas, cette particularité du comportement chimique n'est pas exclusive du malvoside, puisque le paeonoside, diglucoside du paeonidol, se conduit d'une manière semblable, comme le nous verrons tout à l'heure. Mais auparavant il est indispensable de faire quelques remarques concernant les variations du Rf pour une même anthocyanne.

En effet, il semble que la longueur de développement joue un rôle important. C'est ainsi que pour le malvoside nous trouvons un Rf de 0,23 pour une longueur de développement de 31,2 cm et un Rf de 0,27 pour une longueur de 35,7 cm. Dans ces conditions il serait souhaitable qu'une longueur standard soit fixée pour toutes les études chromatographiques des substances polyphénoliques effectuées selon la technique de BATE-SMITH et WESTALL (1950). Une longueur de 31 cm pourrait convenir car elle permet une bonne séparation tout en exigeant un temps de développement raisonnable.

b) *Paeonoside*

Le paeonoside expérimenté a été extrait des pétales des fleurs de la Pivoine rouge (*Paeonia*) par macération dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 pendant 24 heures à raison de 1 g de pétales par 10 ml de solution (BATE-SMITH, 1951; HÄNSEL, 1959). Le pH apparent de cet extrait est voisin de 3,5. Rappelons que la présence du paeonoside dans les fleurs de pivoine a été signalée par WILLSTÄTTER et NOLAN (1915), qui l'ont obtenu à l'état pur.

TABLEAU 3

*Caractéristiques des colorants de pétales de pivoine.
Prises d'essai chromatographiques : 50 µl*

Témoin			Précipité			Liquide surnageant		
Rf	Aspect		Rf	Aspect		Rf	Aspect	
	Visible	UV		Visible	UV		Visible	UV
0,26 (paeonoside)	Rose	Fluor. orange	0,26	Rose	Fluor. rose	0,27	Rose légère	Fluor. orange
0,40	Invisible	Fluor. verte (après NH ₃)				—	—	—
0,56	Invisible	Fluor. verte	0,56	Invisible	Fluor. verte	—	—	—

Bien entendu, l'extrait de paeonoside obtenu par nous est loin d'être pur, mais les impuretés présentes n'empêchent en rien son identification et l'étude de son comportement.

Tout les essais avec cet extrait ont été effectués suivant la même procédure que pour le malvoside.

Comme précédemment, 10 ml de l'extrait de paeonoside ont été traités par 3 ml d'acétate basique de plomb. La chromatographie descendante, d'après BATE-SMITH et WESTALL, de la solution initiale, de la solution du précipité et du liquide surnageant acidulé a donné lieu aux constatations inscrites dans le tableau 3.

En présence d'ammoniaque, ajouté avant l'addition d'acétate basique de plomb, la précipitation de paeonoside et des substances qui l'accompagnent dans l'extrait des pétales de pivoine, est complète, ce que montre le tableau 4.

TABLEAU 4
Caractéristiques des colorants des pétales de pivoine.
Prises d'essai chromatographiques : 50 µl

Témoin			Précipité			Liquide surnageant		
Rf	Aspect		Rf	Aspect		Rf	Aspect	
	Visible	U V		Visible	U V		Visible	U V
			0,14	Invisible	Fluor. bleue	—	—	—
			0,22	Invisible	Fluor. bleue	—	—	—
			0,27	Rose légère faible	Fluor. orange	—	—	—
0,26 (paeonoside)	Rose	Fluor. orange						
0,40	Invisible	Fluor. verte (après NH ₃)	0,40	Invisible	Fluor. verte (après NH ₃)	—	—	—
0,56	Invisible	Fluor. verte	0,56	Invisible	Fluor. verte	—	—	—

Comme on le voit, en milieu ammoniacal, à pH 11 environ, la précipitation du paeonoside est complète. On observe une très légère perte due peut être à la destruction de ce diglucoside. Sans doute, il se produit des modifications des composés colorés puisque nous observons sur les chromatogrammes l'apparition des nouvelles taches fluorescentes. Le cas de l'œnoside est très instructif comme nous le verrons dans ce qui suit.

c) *Œnoside*

Pour ces essais nous avons utilisé les picrates des colorants, préparés en 1959 à partir des pellicules du raisin rouge de *Carignan*, cueilli dans les vignobles du domaine de Pech-Rouge à Gruissan (Aude), appartenant à la Station. La séparation de la

pulpe et des pellicules a été effectuée suivant la technique de RANKINE, KEPNER et WEBB (1958). Les baies séparées à la main étaient pressées entre les doigts, la pulpe et les pépins, une fois expulsés, tombaient sur un grand tamis en tissu de nylon tendu, et les pellicules séparées étaient soigneusement lavées avec de l'eau courante au-dessus du tamis, ensuite avec de l'eau distillée et finalement séchées entre des feuilles de papier filtre. Les anthocyanes des pellicules étaient extraites avec une solution aqueuse acide chlorhydrique à 1 p. 100 suivant la technique de DOURMISCHIDZÉ (1955) basée sur les enseignements de WILLSTÄTTER et de ses collaborateurs (WILLSTÄTTER, ZOLINGER, 1915, 1916; WILLSTÄTTER, MALISSON, 1915), d'ANDERSON et de ses collaborateurs (ANDERSON, 1923, 1924, 1928; ANDERSON, NEBENBAUER, 1927; SHRINER, ANDERSON, 1928), de KARRER et WIDMER (1927).

TABLEAU 5

*Caractéristiques des colorants du raisin de Carignan sous forme de picrates
d'après les taches obtenues.*

Prises d'essai chromatographiques : 50 μ l

Témoin (1)		Acétate de plomb (2)				NH ₃ + acétate de plomb (3)			
Rf	Aspect	Précipité		Liquide surnageant		Précipité		Liquide surnageant	
		Rf	Aspect	Rf	Aspect	Rf	Aspect	Rf	Aspect
0,70	Très faible	0,67	Très faible	—	—	—	—	—	—
0,44	Importante	—	—	—	—	—	—	—	—
0,37 (œno- side)	Deux fois moins im- portante que la précédente (fluor. rose)	0,39	Deux fois plus im- portante que pour (1)	0,39	Très faible	0,38	Plus faible que (1)	—	—
0,34	Assez faible	0,30	Faible	—	—	—	—	—	—
0,25	Faible	0,23	Très faible	—	—	—	—	—	—

Les picrates bruts obtenus contiennent plusieurs anthocyanes, présentes dans l'extrait des pellicules, comme le montrent les chromatogrammes obtenus suivant le procédé de BATE-SMITH et WESTALL (1950). D'ailleurs, RIBÉREAU-GAYON (1954) a signalé que les picrates même cristallisés ne représentent pas une seule substance.

La poudre des picrates bruts a été dissoute, à raison de 500 mg par litre, dans la solution hydroalcoolique dont la composition a été indiquée précédemment. Tous les essais avec cette solution ont été effectués suivant la même procédure que pour le malvoside. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 5.

Comme on le constate, l'acétate de plomb seul provoque la disparition d'une substance colorée de Rf 0,44, la diminution des colorants de Rf 0,34 et 0,25 avec l'augmentation de l'intensité de la tache due à l'œnoside, de Rf 0,39. La précipi-

tation n'est pas complète puisqu'on note la présence d'une faible quantité d'œnoside dans le liquide surnageant. Par contre, l'acétate de plomb en présence d'ammoniaque détruit toutes les substances sauf l'œnoside de Rf 0,38 qui d'ailleurs est également touché.

Ces constatations se retrouvent dans les cas des vins, et en particulier, d'un vin de *Carignan*, comme nous le verrons plus loin.

2°) VINS

Les différents essais ont été effectués sur deux vins, à savoir :

1°) un vin d'hybride *Seyve-Villard* 18315 préparé au laboratoire à partir de raisins cueillis par nous-mêmes à Arzens (Aude) au cours des vendanges 1962 ;

2°) un vin de *Carignan* préparé à partir des raisins cueillis en 1962 au Domaine de la Station à Pech-Rouge (Aude).

Ces raisins ont été vinifiés en bonbonnes de verres de 4 litres, avec ou sans addition d'anhydride sulfureux (50 mg de SO₂ par litre). La durée de cuvaison a été de 25 jours à 26-27°C.

Avant de présenter l'exposé de nos constatations sur les modifications des anthocyanes au cours de leur précipitation par l'acétate de plomb en présence ou en absence d'ammoniaque, nous indiquerons brièvement les résultats de l'expérimentation concernant les différents facteurs de la dite précipitation.

a) *Étude des différents facteurs de précipitation des anthocyanes des vins au moyen de l'acétate de plomb*

Tout d'abord nous avons cherché à établir une dose d'acétate de plomb susceptible de précipiter les colorants sans dépasser le pH 7. L'expérience a montré que l'addition de 3 ml de la solution d'acétate basique de plomb à 10 ml de vin de *Carignan* fait passer le pH de 3,5 à 6,8, mais le milieu devient alcalin pour 3,5 ml d'acétate. Or, d'après les essais effectués, 3 ml d'acétate de plomb n'assurent pas une précipitation complète des anthocyanes des vins de *Carignan* et de *Seyve-Villard* 18315. Le liquide surnageant est coloré en vert dans le cas du dernier vin (couleur du précipité) et légèrement teinté en bleu pour le premier vin.

La précipitation incomplète a été observée dans les vins hybrides *Seyve-Villard* 18283, 23687 et dans un vin de *Morastel-Bouschet*. Il faut préciser que les différentes températures (0°, 18°, 35°, 50°C) restent sans aucun effet sur la précipitation. En outre si l'on opère à une température assez élevée, 50°C par exemple, il se produit un jaunissement des précipités verts, sans doute à cause de l'oxydation.

L'influence de la durée de la précipitation a été étudiée sur le vin de *Seyve-Villard* 18315. Même une attente prolongée entre le moment de l'addition d'acétate basique de plomb et celui de la centrifugation (jusqu'à une vingtaine d'heures) ne permet pas de rendre complète l'extraction des anthocyanes. Également la neutralisation du vin (jusqu'au pH 7), à l'aide d'une solution normale d'hydroxyde de sodium, avant l'addition d'acétate de plomb, n'a pas donné de résultats positifs. Au-delà de 1,5 ml d'acétate de plomb pour 10 ml de vin et jusqu'à 4 ml de réactif on ne remarque aucune amélioration au point de vue de la précipitation des anthocyanes.

Nous avons alors cherché à augmenter le pH du milieu jusqu'à 9,5 11, 11,5,

après l'addition de 3 ml d'acétate de plomb, au moyen de l'ammoniaque. Après acidification les liquides surnageants ont pris une teinte rose. La dilution du vin à moitié ou aux 3/4 est restée également sans effet. Par contre, l'alcalinisation de 10 ml de vin avec 1 ml d'ammoniaque concentré (D-0,9), à pH 10,2-10,4 avant l'addition d'acétate basique de plomb a permis d'obtenir la précipitation complète des anthocyanes du vin étudié, qui, en l'occurrence, est le vin de *Seyve-Villard* 18315.

Remarquons que 0,5 ml d'ammoniaque constitue une dose insuffisante.

C'est l'alcalinisation avant l'addition d'acétate de plomb qui joue un rôle décisif car les sels d'ammonium, tels que le bitratre ou l'acétate d'ammonium, ajoutés en excès, ne favorisent pas la précipitation des anthocyanes, comme d'ailleurs le chlorure de sodium. Le procédé de défécation de NÉGRE (1942, 1945) utilisant la solution d'hydroxyde de sodium, donne, comme nous le verrons plus loin, les mêmes résultats que la technique à l'ammoniaque.

Ajoutons que la double précipitation par l'emploi d'acétate neutre de plomb en solution aqueuse saturée et d'acétate basique, tous les deux ajoutés à raison de 3 ml, ne donne pas de résultats positifs.

b) Essais principaux

Les essais principaux ont été effectués, comme pour les substances de référence, à savoir, on ajoute à 10 ml de vin, 3 ml d'acétate basique ; après agitation et repos de 15 minutes on centrifuge à 5 000 tours/minute pendant 15 minutes. Ensuite on effectue la chromatographie descendante de partage sur papier Whatman n° 1, selon la méthode de BATE-SMITH et WESTALL (1950), des colorants du précipité et du liquide surnageant. Les premiers sont solubilisés par 10 ml d'acide chlorhydrique à 4 p. 100 dans le méthanol, et la régénération des seconds est obtenu par l'addition d'acide chlorhydrique concentré en quantité suffisante pour obtenir le pH 3.

La précipitation en présence d'ammoniaque s'effectue comme précédemment : on ajoute au vin 1 ml de ce réactif, on agite et on attend 5 minutes avant l'addition d'acétate de plomb.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6 pour chaque vin expérimenté. Pour mieux apprécier la correspondance entre les anthocyanes et leurs Rf, nous avons réuni les données correspondantes trouvées dans différentes publications dans le tableau 7.

a. Vin de Carignan.

L'acétate basique de plomb seul provoque la précipitation presque complète de tous les colorants. Les substances des Rf 0,18-0,20 et 0,26-28 se retrouvent dans le précipité, tandis que celles des Rf 0,40 et 0,52 semblent disparaître, surtout la première qui correspond, sans doute, à l'œnoside. D'ailleurs il faut admettre que la substance formée de Rf 0,33-0,35 s'apparente à ce dernier. Une faible quantité de ce colorant est présente dans le liquide surnageant. Nous avons vu le même phénomène dans le cas des picrates des colorants du raisin *Carignan*.

En présence d'ammoniaque, la précipitation est complète.

La figure 1 présente deux chromatogrammes et rend plus aisée leur comparaison.

En utilisant la technique de BATE-SMITH et WESTALL (1950), nous avons remarqué que la plupart des anthocyanes donnent naissance à une fluorescence rose en

lumière de Wood. Dans le cas du vin de *Carignan* les trois taches des Rf 0,52, 0,40, et 0,33-0,35 sont fluorescentes .

Il faut considérer que la substance de Rf 0,33-0,35 correspond à l'œnoside, dont le comportement chromatographique paraît être modifié après la précipitation

TABLEAU 6

*Caractéristiques des colorants des vins de Carignan et de S.-V. 18315
d'après les taches obtenues.
Prises d'essai chromatographiques : 50 µl*

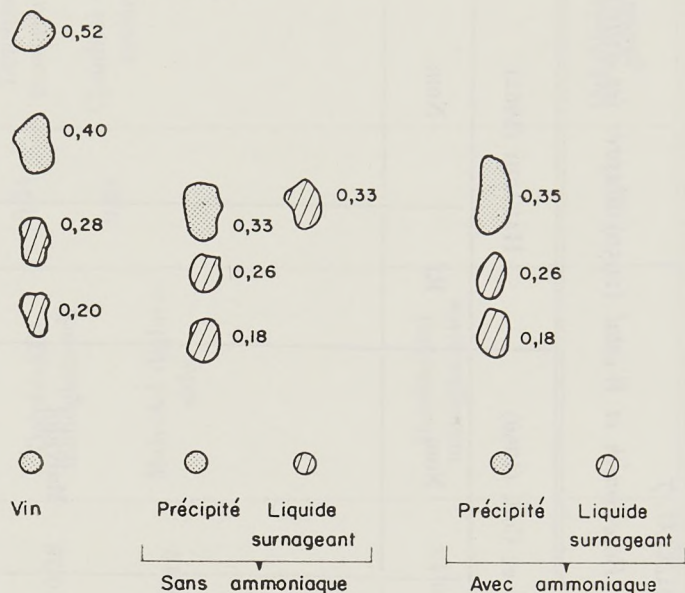
T — Témoin		A — Sans l'ammoniaque				B — En présence d'ammoniaque			
		Précipité		Liquide surnageant		Précipité		Liquide surnageat	
Rf	Aspect	Rf	Aspect	Rf	Aspect	Rf	Aspect	Rf	Aspect
A — Vin de <i>Carignan</i>									
0,20		0,18		—	—	0,18		—	—
0,28		0,26		—	—	0,26		—	—
		0,35	Importante	0,33	Faible	0,33	Importante	—	—
				—	—			—	—
0,40 (œno- side)	Importante			—	—			—	—
0,52 (mal- vidol)	Moins impor- tante que la précédente			—	—	—		—	—
				—	—	—		—	—
				—	—	—		—	—
B — Vin de <i>Seyve-Villard 18.315</i>									
0,11		0,10	Plus faible que T	—	—	0,13	Plus faible que A	—	—
0,19		0,18	Plus faible que T	—		0,19	Plus faible que A	—	—
0,28		0,27	Plus faible que T	0,28	Fluor. en UV	0,28	Plus faible que A	—	—
		0,38	Fluor. rose en UV	—		0,39	Fluor. rose en UV	—	—
0,48	Très légère	0,43	Fluor. rose en UV	—		0,45	Fluor. rose en UV	—	—

au moyen d'acétate basique de plomb, le développement des chromatogrammes étant identique.

Au sujet de cette substance nous nous sommes posés la question suivante : est-ce qu'au cours de la chromatographie simplifiée, utilisant le tampon de BRITTON et

ROBINSON, consécutive à la précipitation des colorants par l'acétate de plomb, n'introduit-on pas une confusion dans la détection du malvoside?

En général, les essais effectués sur le vin de *Carignan* avec et sans l'utilisation de l'acétate de plomb, montrent que la méthode simplifiée ne permet pas de se rendre compte des transformations produites sur les anthocyanes par l'acétate de plomb en raison du très mauvais pouvoir séparateur du solvant chromatographique. Cependant il ne peut y avoir confusion entre l'œnoside et le malvoside. En effet, la chromatographie simplifiée du liquide surnageant donne naissance à une tache fluorescente en rose à la lumière de Wood de très faible R_f (0,05) tandis que le R_f du malvoside dans ces conditions est de l'ordre de 0,30.



Vin de Carignan -1962-

FIG. 1. — Chromatogrammes

Une autre constatation concerne les modifications possibles des anthocyanes au cours de l'élaboration des chromatogrammes. Suivant les cas, pour le même vin, nous avons constaté les variations de l'intensité des taches des R_f 0,40 et 0,52. En général, la tache principale du vin de *Carignan* est de R_f 0,40 avec à côté une tache plus faible de R_f 0,52 (malvidol). Mais dans d'autres cas la tache R_f 0,52 est plus importante que la tache de R_f 40. Cela démontrerait que malgré l'emploi des dispositifs perfectionnés (DEIBNER, BOURZEIX, 1960, 1963). et l'utilisation du courant d'air froid, des anthocyanes seraient susceptibles de subir des modifications sensibles.

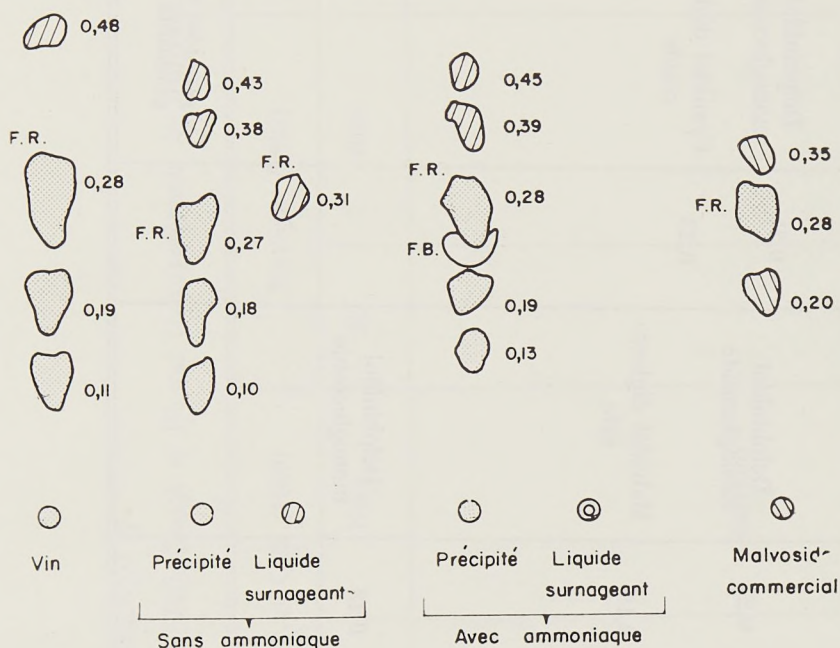
Nous avons déjà dit que l'acétate de plomb basique détruit l'anthocyanne de R_f 0,52 et modifie le comportement chromatographique du colorant de R_f 0,40, puisque ce R_f devient de l'ordre de 0,33. D'ailleurs sa précipitation en milieu neutre n'est pas complète, ce qui supposerait l'existence pour ce colorant de formes différentes, dont l'une est peut être la conséquence plus profonde de l'action de l'acétate de plomb.

TABIEAU 7
Tableau des Rf anthocyanes suivant la technique de Bate-Smith et Westal (1950) d'après les différents auteurs

HARBORN (1958)		BATE-SMITH (1949)		PRATT et Coll. (1960)		HAYASHI (1962)		ALBACH et Coll. (1963)	
Rf	Nom	Rf	Nom	Rf	Nom	Rf	Nom	Rf	Nom
0,80	Pelargonidol								
0,71	Paeonidol							0,71	Paeonidol
0,68	Cyanidol	0,59	Pelargonidol monoglucoside					0,67	Cyanidol
0,58	Malvidol				Malvidol			0,56	Malvidol
0,52	Petunidol			0,50				0,47	Petunidol
		0,47	Paeonidol mono-glucoside						
0,44	Pelargonidol monoglucoside								
0,42	Delphinidol								
0,41	Paeonidol mono-glucoside	0,40	Malvidol mono-glucoside						
	Malvidol mono-glucoside				Malvidol mono-glucoside				
0,31	Pelargonidol diglucoside	0,34	Pelargonidol diglucoside						
	Paeonidol diglucoside					0,31	Paeonidol diglucoside		
						0,30	Malvidol diglucoside		
0,28	Cyanidol diglucoside	0,33	Cyanidol monoglucoside			0,24	Delphinidol monoglucoside		
0,26	Delphinidol monoglucoside	0,26	Paeonidol monoglucoside	0,28	Delphinidol monoglucoside	0,23	Cyanidol diglucoside		
0,24	Petunidol diglucoside	0,22	Malvidol diglucoside	0,19	Malvidol diglucoside				
		0,16	Cyanidol diglucoside Delphinidol monoglucoside						
0,15	Delphinidol diglucoside	0,11	Delphinidol diglucoside	0,13	Delphinidol monoglucoside				
						0,11	Delphinidol diglucoside		
								0,34	Delphinidol

β. *Vin de Seyve-Villard 18315.*

Les résultats du tableau 6 et le croquis chromatographique 2 montrent que l'acétate de plomb seul ne précipite pas complètement le malvoside, puisque le liquide surnageant en contient une quantité non négligeable. En partant du vin de S. V. 18315 on constate des pertes assez sensibles pour les substances de Rf 0,11, 0,19, 0,28 et l'apparition d'un corps de Rf 0,38, possédant une fluorescence en lumière de Wood. L'anthocyanne de Rf 0,48 semble être remplacé par celui de Rf 0,43. Peut-être s'agit-il du même corps? Les mêmes modifications s'observent sur les colorants précipités par le même réactif en présence d'ammoniaque, mais, par contre, leur précipitation est complète.



Vin de S.V 18315

- 1962 -

FIG. 2. — Chromatogrammes

3°) ÉTUDE DE LA MÉTHODE ALLEMANDE OFFICIELLE DE DÉTECTION DES ANTHOCYANNES DIGLUCOSIDIQUES

La méthode allemande de détection des diglucosides, recommandée par l'Office fédéral de la Santé aux Instituts d'Analyse (1961), est basée sur les emplois successifs d'acétate de plomb neutre, destiné à éliminer les substances colorées autres que les diglucosides et de l'ammoniaque nécessaire pour provoquer la précipitation de ces derniers. Après lavage le précipité est dissous dans l'acide chlorhydrique et c'est sur la solution obtenue que l'on effectue la détection des diglucosides au moyen de la chromatographie circulaire utilisant un solvant composé de butanol, d'acide acétique et d'eau.

A la lumière des résultats des recherches, exposés précédemment, nous avons cru utile de vérifier l'efficacité de la méthode allemande au point de vue de la sépa-

ration et du recouvrement des diglucosides pendant les opérations préconisées par cette méthode.

Comme on le sait, on effectue d'abord l'élimination de certains constituants du vin à l'aide de 5 ml d'une solution d'acétate neutre de plomb à 10 p. 100 ajoutés à une prise d'essai de 25 ml. Après centrifugation pendant 3-5 minutes à 3 000 tours/minute on sépare le liquide surnageant auquel sont ajoutés 5 ml d'eau de lavage du précipité. Ce précipité, censé ne pas contenir d'anthocyanes diglucosides, est éliminé. Les liquides réunis sont traités par une dizaine de gouttes d'ammoniaque à 25 p. 100, pour précipiter les diglucosides. Après une centrifugation on élimine le liquide surnageant incolore et on s'intéresse au précipité ammoniacal obtenu.

Nous nous sommes posé les deux questions suivantes :

1) Est-ce qu'en rejetant le premier précipité obtenu par addition de l'acétate de plomb, on ne perd pas une partie des diglucosides ?

2) Est-ce que le liquide surnageant, obtenu après l'addition de l'ammoniaque, ne contient pas également une partie des diglucosides à détecter ?

Nous avons utilisé pour nos essais de vérification deux vins rouges de goutte élaborés à la Station en 1962, en l'absence de rafles, à 26°C, sans addition d'anhydride sulfureux et décués au bout de 25 jours. Le premier vin a été obtenu à partir de raisins d'hybride *Seyve-Villard* 18315, cueilli par nous-mêmes en 1962 à Arzens (Aude). Le deuxième vin correspondait au mélange de vin précédent et de vin de *Carignan*, élaboré dans les mêmes conditions à partir de raisins cueillis au domaine expérimental de Pech-Rouge (Aude). Ce mélange comprenait 98 p. 100 de vin de *Carignan* et 2 p. 100 de vin hybride en volume.

Nous avons effectué sur ces deux vins toutes les opérations préconisées par la méthode allemande pour obtenir d'abord le précipité résultant de l'addition de l'acétate de plomb et ensuite le liquide surnageant éliminé après la formation du précipité des diglucosides sous l'action de la solution d'ammoniaque.

a) *Étude du premier précipité*

Le premier précipité a été repris par 25 ml de mélange de méthanol (340 ml) et d'acide chlorhydrique concentré, de densité 1,19 (40 vol.). Après la séparation du précipité blanc de chlorure de plomb, le liquide rouge a été soumis à l'examen chromatographique simplifié basé sur la chromatographie ascendante sur papier Arches 302, employant la solution-tampon de BRITTON-ROBINSON comme liquide de développement, et suivant la technique de chromatographie de partage descendante de BATE-SMITH et WESTALL (1950). Dans les deux cas les chromatogrammes séchés pendant 20 mn à 35°C ont été examinés à la lumière de Wood. Notons que les prises d'essai chromatographiques ont été de 50 μ l. Voici les résultats obtenus :

α . Chromatographie simplifiée.

1) *Vin de Carignan contenant 2 p. 100 de vin de Seyve-Villard 18315.*

Une faible fluorescence rose de même Rf que le malvoside témoin démontre qu'une petite partie, de l'ordre de 10 p. 100, de cet anthocyanne contenu dans les 2 p. 100 de vin hybride est précipitée par l'acétate de plomb.

2) *Vin d'hybride pur.*

Le chromatogramme obtenu présente les trois taches dues aux trois anthocyanes diglucosidiques, la tache correspondant au malvoside étant relativement moins importante.

La comparaison avec le chromatogramme obtenu directement à partir du vin montre qu'une partie non négligeable des substances colorées diglucosidiques est précipitée par l'acétate de plomb.

β. Chromatographie de partage descendante.

La chromatographie de partage confirme que le précipité contient une partie des diglucosides à détecter.

1) *Mélange des vins.*

Une légère fluorescence rose de la tache de R_f correspondant au malvoside indique qu'une partie de cette anthocyanne a été précipitée par l'acétate de plomb.

2) *Vin d'hybride.*

La présence d'une tache fluorescente en rose montre qu'une partie, faible mais non négligeable, du malvoside est précipitée. Les taches de deux autres diglucosides apparaissent plus nettes, ce qui montre qu'une fraction non négligeable de ces diglucosides est également précipitée.

En conclusion, on peut dire que l'acétate de plomb précipite une partie des diglucosides qu'on cherche à détecter.

b) Étude du liquide surnageant final

Au liquide surnageant, après la séparation du précipité formé à la suite de l'addition de l'acétate de plomb, on ajoute, suivant les prescriptions du procédé allemand, 10 gouttes d'une solution d'ammoniaque à 25 p. 100. Cette addition provoque une précipitation. Mais les essais effectués sur deux vins expérimentés ont montré que 10 gouttes ne suffisent pas à assurer le passage en milieu nettement alcalin ; tout au plus on atteint le pH 7. L'addition de cinq nouvelles gouttes d'ammoniaque produit une nouvelle précipitation sans modifier le pH du milieu. Finalement, trois autres gouttes supplémentaires amènent le pH du liquide à 8,8, en provoquant en même temps une nouvelle précipitation. Après la centrifugation habituelle le liquide surnageant, à éliminer, est limpide, mais coloré en vert, couleur du précipité.

Le précipité ammoniacal et le liquide surnageant final sont traités séparément par quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le liquide surnageant se colore en rose ce qui prouve qu'il contient encore des quantités importantes de substances anthocyaniques.

L'étude chromatographique de deux solutions acides obtenues ont donné les résultats présentés ci-dessous :

*α. Chromatographie ascendante simplifiée*1) *Mélange de vin de Carignan (98 %) et de vin hybride de Seyve-Villard 18315 (2 %).*

Précipité ammoniacal. — Après dissolution du précipité dans 25 ml du méthanol chlorhydrique à 4 p. 100 on fait la chromatographie suivant le processus habituel.

Le chromatogramme obtenu présente une tache fluorescente rose qui semble indiquer par son importance et son intensité, comparées à celles de la fluorescence rose fournie par la chromatographie directe de 50 μ l de mélange, que seulement 50 à 60 p. 100 du malvoside, issu des 2 p. 100 du vin d'hybride, se trouvent dans le précipité ammoniacal, soumis à l'examen chromatographique dans le procédé allemand.

Liquide surnageant. — Le chromatogramme obtenu possède une tache, avec une légère fluorescence rose, de même Rf que le malvoside témoin. Cette fluorescence indique qu'une faible partie des diglucosides se trouve dans le liquide surnageant final à éliminer. Remarquons en passant que les anthocyanes du vin de Carignan constitués principalement des monoglucosides, de Rf plus faibles que les anthocyanes de vin hybride semblent, d'après les chromatographies obtenues, se retrouver par moitié dans le premier précipité formé par l'acétate de plomb et par moitié dans le précipité ammoniacal et seulement à l'état de traces dans le liquide surnageant final.

2) *Vin de Seyve-Villard 18315.*

Précipité ammoniacal. — La chromatographie montre qu'environ 50 p. 100 de chacun des trois diglucosides qui constituent l'essentiel des anthocyanes du vin se retrouvent dans le précipité.

Liquide surnageant. — Il ressort de l'étude chromatographique que le liquide surnageant ne contient que du malvoside, environ 40 p. 100 de la dose initiale.

3. *Chromatographie de partage descendante.*

Bien entendu, l'examen des chromatogrammes aboutit aux mêmes conclusions que celles fournies par la chromatographie ascendante simplifiée.

1) *Mélange de vins.*

Voici les résultats obtenus :

— Le précipité obtenu par addition d'acétate de plomb contient des quantités de malvoside non négligeables et environ la moitié des anthocyanes du vin de Carignan.

— Le précipité ammoniacal ne contient que 50 à 60 p. 100 des anthocyanes issus de 2 p. 100 d'hybride et environ la moitié des colorants du vin de Carignan.

— Le liquide surnageant final contient une très faible partie des anthocyanes du Seyve-Villard 18315 principalement constituée par du malvoside, et également des traces non négligeables des anthocyanes du Carignan.

2) *Vin de Seyve-Villard 18315.*

Dans le cas de vin de Seyve-Villard 18315 les conclusions sont les suivantes :

— Le précipité formé par l'acétate de plomb contient une partie importante (40 p. 100) des deux premiers diglucosides et 10 p. 100 environ du malvoside.

— Le précipité ammoniacal ne contient qu'environ 50 p. 100 de l'ensemble des anthocyanes. Cette constatation est valable, en particulier, pour le malvoside.

— Le liquide surnageant final comprend 40 p. 100 du malvoside initial tandis que les deux autres diglucosides sont absents.

Pour les deux vins expérimentés l'ensemble des résultats obtenus par les deux procédés chromatographiques, permet de conclure que la technique allemande néglige 50 p. 100 environ des constituants colorés qu'il s'agit de détecter.

4^o) ÉTUDE DU PROCÉDÉ DE DÉFÉCATION DE NÈGRE

Le procédé de défécation des vins indiqué par NÈGRE (1942, 1945) permet de précipiter totalement des anthocyanes et, d’une façon générale, tous les polyphénols. Voici son mode opératoire : dans un ballon jaugé de 50 ml on met 25 ml de vin, 10 ml de solution d’hydroxyde de sodium à 4 p. 100, 5 ml d’acétate neutre de plomb en solution aqueuse saturée. Après agitation et repos de 2-3 minutes, on additionne 5 ml de sulfate de sodium en solution aqueuse saturée pour précipiter l’excès de plomb ; ensuite on complète au trait avec de l’eau distillée, on agite et on filtre.

TABEAU 8

*Caractéristiques des anthocyanes des vins de Carignan et de Seyve-Villard 18315
traités par la méthode Nègre.
Prises d’essai chromatographiques : 50 µl*

Vin	Taches chromatographiques			
	Témoin		Précipité	
	Rf	Aspect	Rf	Aspect
Carignan	0,18	Légère	0,18	Légère
	0,29	Légère	0,23	Légère
	0,39	Assez importante	0,31	Importante
	0,53	Importante		
Seyve-Villard 18315 ⁽¹⁾	0,10		0,10	En légère diminution
	0,15		0,15	En forte diminution
	0,23		0,23	En légère diminution
			0,31	

(1) Longueur de développement insuffisante

Nous avons expérimenté ce procédé sur les mêmes vins que précédemment. Ces vins étant relativement très colorés, la dose d’acétate neutre de plomb a été portée à 6 ml. Dans ces conditions la précipitation des substances colorées est complète. Après la séparation du précipité par centrifugation, les liquides surnageants alcalins (pH 10) acidifiés à l’aide d’acide chlorhydrique pour obtenir le pH 3, restent incolores.

En ce qui concerne les anthocyanes précipitées et régénérées par 25 ml de méthanol chlorhydrique à 4 p. 100, leur étude chromatographique suivant la méthode de BATE-SMITH et WESTALL montre qu’elles subissent des modifications sensibles. Les colorants les plus altérés sont ceux du vin de Carignan comme le montre le tableau 8.

Comme on le voit, les colorants du vin de Carignan se comportent différemment suivant leur nature. C’est ainsi que les substances caractérisées par les Rf 0,18,

0,26 ne sont que peu modifiées ; par contre, celles de Rf 0,39 et 0,53 disparaissent et vraisemblablement donnent naissance au corps de Rf 0,31. Ce phénomène a déjà été constaté au cours de l'emploi de procédés précédemment décrits. Les anthocyanes du vin de *Seyve-Villard* 18315 montrent une résistance plus prononcée ; on note une légère diminution de l'intensité des taches de Rf 0,10 et 0,23 une forte diminution pour le corps de Rf 0,15 et une apparition d'une légère tache de Rf 0,31.

D'une façon générale, le procédé de NÈGRE donne les mêmes résultats que la technique de précipitation au moyen de l'ammoniaque à 28 p. 100 et d'acétate basique de plomb, expérimentée précédemment avec peut-être une meilleure sédimentation du précipité.

III — CONCLUSION

Si l'utilisation des acétates de plomb neutre et basique comme réactif de précipitation pour l'isolement et pour la concentration des anthocyanes est largement répandue depuis longue date, par contre, les connaissances concernant leur pouvoir sélectif et leur effet sur l'intégrité chimique des substances colorées et, en particulier, de celles des vins rouges, étaient plutôt rares.

Cette circonstance nous a amené à étudier le comportement, d'une part, de solutions d'anthocyanes plus ou moins pures et, d'autre part, des substances colorées des vins rouges en présence d'une solution d'acétate basique de plomb commerciale (D_{15} 1,32) tant au point de vue de leur précipitabilité que de celui de leur stabilité en fonction de différents facteurs du milieu.

Tout d'abord les essais effectués ont montré que l'acétate utilisé n'est pas susceptible de provoquer la précipitation complète des diglucosides anthocyaniques, tels que le malvoside et le paeonoside, puisque une partie de ces corps, de l'ordre de 10 p. 100, reste en solution malgré l'introduction de l'excès du réactif ou l'alcalinisation consécutive à la précipitation. Cet état de choses pourrait être expliqué soit par l'existence d'une forme particulière des anthocyanes à côté de la forme précipitable, soit par la ou les modifications d'une partie des diglucosides sous l'action du réactif précipitant.

Par contre, l'alcalinisation du milieu à pH 10-11, à l'aide d'ammoniaque, avant l'addition d'acétate de plomb, détermine une précipitation complète des diglucosides étudiés, ce qui ne s'est pas produit lorsque l'alcalinisation est faite après addition d'acétate de plomb.

Sans doute, s'agit-il d'une réaction chimique particulière, dont le mécanisme nous échappe pour le moment.

Les monoglucosides, comme l'œnoside, par exemple, sont précipités plus complètement quoique, en absence de l'ammoniaque, une petite partie de cette anthocyanne demeure dans la solution.

Même en milieu ammoniacal, l'acétate de plomb influe peu sur l'intégrité chimique des diglucosides ; au contraire, les monoglucosides et les aglycones, comme le malvidol, par exemple, subissent des modifications sensibles allant jusqu'à leur destruction, même en présence d'acétate de plomb seul, en milieu faiblement acide ou neutre.

Par suite, toutes ces constatations ont été confirmées par les résultats d'essais effectués avec les vins rouges riches en diglucosides et avec les vins dépourvus de ceux-ci.

Dans ces conditions, la solution d'acétate basique de plomb commerciale ne constitue par un réactif de choix pour une séparation quantitative des anthocyanes des vins rouges, même en milieu faiblement acide ou presque neutre, en raison de la précipitation imparfaite des diglucosides et des modifications chimiques d'un certain nombre de substances colorées. Toutefois, il pourrait être utilisé pour l'isolement des diglucosides en milieu alcalin puisque leur stabilité chimique paraît être peu affectée dans ces conditions trop dures pour l'intégrité des anthocyanes des vins *Vitis vinifera* comme celui de *Carignan* rouge.

D'ailleurs la stabilité chimique va en décroissant en commençant par les diglucosides vers les anthocyanidols. Ces derniers sont très fragiles puisqu'ils disparaissent plus facilement pendant la précipitation au moyen de l'acétate de plomb. Comme nous l'avons constaté, l'œnoside peut parfois subir une décomposition, en donnant naissance au malvidol, au cours des longues élaborations des chromatogrammes même avec l'utilisation des dispositifs perfectionnés et un courant d'air froid.

A la lumière de ces enseignements il est plus aisé de comprendre les imperfections de certains procédés d'isolement des anthocyanes diglucosidiques à partir des vins rouges effectués en vue de leur détection.

Il ressort de toutes ces constatations que l'emploi d'acétate de plomb doit être préconisé avec un grand discernement surtout dans les cas où on cherche à isoler quantitativement et sans modification chimique les anthocyanes de la vigne.

Reçu pour publication en août 1963.

SUMMARY

ON THE EXTRACTION OF COLOURED POLYPHENOLIC COMPOUNDS OF RED WINES WITH LEAD ACETATE

The research carried out was aimed at obtaining fuller information on the behaviour of the anthocyanins of red wines in the presence of a commercial solution of basic lead acetate with regard to peculiarities in the formation of insoluble salts and the chemical stability of the colouring.

The results suggest, in the case of the diglucosides such as malvoside and paenoside, the existence of particular structures or of provoked modifications which were responsible for the incomplete precipitation of the lead salts. On the other hand, the stability was relatively greater than that of the monoglucosides, like œnoside, which undergo modification more easily, leading eventually to their destruction.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBACH R., KEPNER R., WEBB A., 1963. Peonidine 3-monoglucoside in *Vinifera* grapes. *J. Food Sci.*, **28**, n° 1, 55.
AMIEL J., P. DUPUY, NORTZ M., 1955. Contribution à l'étude d'une méthode d'extraction des composés polyphénoliques de certaines Ampélidées. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **240**, 780-782.

- AMIEL J., DUPUY P., 1955. Contribution à l'étude des colorants polyphénoliques chez les Ampélidées. Actes Congrès de Caen, 74 Session Ass. Fr. pour l'Avanc. Sci., 115.
- ANDERSON R., 1923. A contribution to the Chemistry of Grape Pigments. *J. Biol. Chem.*, **57**, 795.
- ANDERSON R., 1924. A contribution to the Chemistry of Grape Pigments. *J. Biol. Chem.*, **61**, 97, 695.
- ANDERSON R., 1928. A contribution to the Chemistry of Grape Pigments. *J. Biol. Chem.*, **80**, 743.
- ANDERSON R., NEBENBAUER P., 1927. Ein Beitrag zur Chemie der Farbstoffe der Weinbeere. *Chem. Ztschr.*, **1**, 616.
- ANONYME, 1961. Détection des hybrides rouges dans le vin et les moûts (titre trad.). *Bundesgesundheitsblatt*, n° 2427, 27 janvier.
- BATE-SMITH E., 1951. Partition chromatography. *Biochem Soc. Symposium* **3**, 68, Cambridge.
- BATE-SMITH E., WESTALL R., 1950. Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochem. Biophys. Acta*, **4**, 427-440.
- BERGERET J., 1961. Sur la séparation des pigments anthocyaniques du vin par chromatographie circulaire sur papier. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 844.
- BIOL H., FOULONNEAU Ch., 1963. Décoloration des vins rouges par certains sels de métaux lourds. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° 1, 27.
- BOCKIAN A., KEPNER R., WEBB A., 1955. Skin Pigments of the *Cabernet Sauvignon* Grape and Related Progeny. *Agric. Food Chem.*, **3**, 695.
- BRACONNOT H., 1807. Observations sur le *Phytolacca vulg.* raisin d'Amérique. *Ann. Chimie*, Paris, **62**, 71.
- BUCHANAN M., LEWIS H., WEBER B., 1950. Purification and Chemical Properties of certain Vegetable Tannins. *J. Amer. Leather Chem. Assoc.*, **45**, 513.
- CABANNES J., 1953. Le pH pondéré et ses possibilités. *Ch. Anal. Fr.*, **35**, n° 2, 28.
- CHANDLER B., 1958. Anthocyanins of Blood Oranges. *Nature*, **182**, 933.
- CHANDLER B., HARPER K., 1962. A procedure for the absolute identification of anthocyanins : the pigments of Blackcurrant fruit. *Austr. J. Chem.*, **15**, 114.
- CHEVALLIER A., 1827. Essais sur la matière colorante des vins naturels. Séance Ac. Royale, Méd., Section Pharm. (avril 1827). *J. Pharm.*, **13**, 293.
- CLARENS J., 1921. Application des lois de la cinétique chimique à l'analyse quantitative : du dosage fractionné des tannins en général et des tannins de vin, en particulier. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **29**, 837.
- COUX C. M^{lle}, VITTE G., 1960. Sur la recherche de vins provenant d'hybride. *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 7 décembre.
- COUX C., M^{lle} VITTE G., FAUCONNEAU G., 1961. Sur la recherche de vins provenant d'hybrides. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **100**, 6.
- DEIBNER L., 1952. État actuel du dosage direct des substances colorantes du raisin et du vin d'après les récents travaux. *Ann. Technol. agric.*, **1**, n° 3, 345.
- DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960. Appareil permettant la pose facile et le séchage rapide et simultané de plusieurs taches et bandes de départ sur les chromatogrammes. *Ann. Technol. agric.*, **9**, n° 4, 409.
- DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963. Dispositifs pour la préparation rapide des chromatogrammes à développements radial et classique. *Ibidem*, **12** n° 2, 141.
- DERIBÉRE M., 1950. Du pH classique de Sorensen au pH pondéré de Levasseur. *Ch. et Ind.* **64**, n° 6, 708.
- DOURMISCHIDZE S., 1948. Dosage de l'œnidine dans le raisin et dans le vin (titre trad.). *Biochimija U.R.S.S.*, **13**, n° 1, 16.
- DOURMISCHIDZÉ S., 1955. Substances tanniques et anthocyanes de la vigne et du vin (titre trad.). 85, *Ac. Sci. U. R. S. S.*, Moscou.
- DRAWERT F., 1960. Eine Methode zum papierchromatographischen Nachweis der Anthocyane insbesondere Hybridenanthocyane in Rotmosten und Rotweinen. *Vitis*, **2**, 169.
- DRAWERT F., 1961. Über Anthocyane in Trauben, Mosten und Weinen. Methoden zur Anreicherung und Trennung der Farbkomponenten. *Vitis*, **2**, 288.
- FAUCONNEAU Y., VITTE G., 1960. Détection de faible quantité de vin, provenant d'hybrides dans un vin à appellation. Communication. *Ann. Fals. Fraud.*, **53**, 568.
- FOUASSIN A., 1956. Identification par chromatographie des pigments anthocyaniques des fruits et des légumes. *Revue Ferm. Ind. Alim.*, Bruxelles, **11**, n° 4, 173.
- GAUTIER A., 1877. Sur l'œnotanin ou tanin du vin. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **27**, 496.
- GAUTIER A., 1878. Sur les matières colorantes des vins. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **86**, 1507.
- GEISSMAN T., 1955. Anthocyanins, chalcones, aurones, flavons and related water-soluble plant pigments. Dans PAECH K., TRACEY M. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, **3**, 462, Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg.
- GLÉNARD A., 1858. Recherches sur la matière colorante du vin. *Ann. Chim. Phys.*, Paris, (3), **54**, 366.
- HAYASHI K., 1962. The anthocyanins. Dans GEISSMAN T. *The chemistry of flavonoid compounds*, **255**, Pergamon Press, Oxford — London — New York — Paris.
- HAYASHI K., NOGUCHI T., ABE Y., 1954. Studien über Anthocyane. XXIV. Karacyanin-ein Farbstoffprinzip in de feuerroten Blüten in *Canna generalis*. *Pharm. Bull.*, (Jap), **2**, 4.
- HÄNSEL R. Zellsaftlösliche Pigmente (Anthocyane und Flavonoide). Dans LINSKENS H. 1959. *Papierchromatographie in der Botanik* 228-229, Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg.

- JOHNSON G., FORMAN E., MAYER M., 1950. The ultraviolet absorption of polyphenolic substances from various fruits. *Food Techn.*, **4**, 237.
- KAIN W., 1961. Anreicherung der roten Direktträgerfarbstoffe durch fraktionierte Bleifällung. *Mitt. Klosterneuburg*, XI-A, 194.
- KARRER P., WIDMER R., 1927. Untersuchungen über Pflanzenfarbstoffe. I Über die konstitution einiger Anthocyanidine. *Helv. Chem. Acta*, **10**, 5.
- LEVASSEUR A., 1949. Sur l'interprétation par la notion de pH pondéré des mesures de pH concernant les milieux pauvres en eau. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **228**, 1648.
- MANCEAU E., 1897. Sur le tanin de la galle d'Alep et de la galle de Chine. *Thèse*, Paris.
- MAUMENÉ E., 1890. Traité théorique et pratique du travail des vins. **1**, 169, Bernard Éd. Paris.
- MEUNIER L., 1953. Tannins et tannage. Dans GRIGNARD V. *Traité de chimie organique*, **22**, 487, Masson Éd. Paris.
- MULDER G., 1856. *Chemie des Weines*, Leipzig.
- NÈGRE E., 1942. Les matières tannoïdes et la composition des vins. *Bull. Office Intern. Vins*, **15**, n° 154, 20.
- NÈGRE E., 1945. Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin. *Thèse Sci.*, Montpellier.
- NICKLÈS J., 1859. Sur la matière colorante du Troène et son application à la recherche des eaux potables. *J. Pharm. Chim.*, **35**, 328.
- ONSLow M., 1925. The anthocyanin pigments of plants, 52-53. *University Press*, Cambridge.
- PETRI W., 1903. Untersuchungen über den Gerbstoff und Farbstoff der Früchte des Weinstockes und deren Gärungsprodukte (Rotwein), München.
- POWERS J., SOMAATMADJA D., PRATT D., HANDY M., 1960. Anthocyanins II. Action of anthocyanin pigments and related compounds on the growth of certain microorganisms. *Food Technol.*, **14**, n° 12, 626.
- RANKINE B., KEPNER R., WEBB D., 1958. Comparaison of anthocyan pigments of *Vinifera* Grapes. *Amer. Journ. Enol.*, **9**, n° 2, 105-110.
- REICHEL L., STROH H., REICHWALD W., 1957. Über die Farbstoffe der schwarzen Holunderbeere. *Naturwiss.*, **44**, 468.
- RENTSCHLER H., TANNER H., BRUNNER M., 1961. Zur Identifizierung der für rote Hybridentraubensäfte und Weine charakteristischen Anthocyanfarbstoffe. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **52**, n° 4, 312.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1953. Différenciation des matières colorantes des raisins et des vins des cépages français et hybrides. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **39**, 800.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Étude de la matière colorante des raisins rouges : application à la différenciation des cépages et des vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **47**, 436.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1956. Observations sur la différenciation de la matière colorante des vins rouges. *Ann. Fals. Fraudes*, **49**, 382.
- SASTRY L., TISCHER R., 1952. Stability of the anthocyanin pigments in *Concord* grape juice. *Food Techn.*, **6**, n° 7, 264.
- SCHANDERL H., 1962. Der Einfluss von Polyphenolen und Gerbstoffen auf die Physiologie der Weinhefe und der Wert des pH-7 Testes für die Auswahl von Sektgrundweinen. *Mitt. Klosterneuburg*, **12** A, n° 6, 265.
- SENGEWALD H., 1961. Untersuchungen über die Anthocyane insbesondere über das Malvin. Beitrag zur Kenntnis der Papierchromatographie, Gewinnung und Eigenschaften der Anthocyane. Dissert Univ. Frankfurt am Main.
- SHRINER R., ANDERSON R., 1928. A contribution to chemistry of grape pigments. V- The anthocyanins in grapes. *J. Biol. Chem.*, **80**, 743.
- TANNER H., RENTSCHLER H., SENN G., 1963. Über die Charakterisierung von Anthocyanfarbstoffen mittels Dünnschicht-Chromatographie. *Mitt. Klosterneuburg*, XII A, 156.
- TANRET 1894. Sur la picéine, glucoside des feuilles du sapin épicéa. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **119**, 80.
- VALLET H., 1951. Le pH classique et le pH pondéré. *Mem. Soc. Ing. Civ. Fr.*, **104**, 289.
- WHITE T., 1956. The scope of vegetable tannin chemistry. The chemistry of vegetable tannins. *Symposium*, 20, Soc. Leather Trades' Chem. Croydon.
- WILLSTÄTTER R., EVEREST A., 1913. Über den Farbstoff der Kornblume *Liebig's Ann. Chem.*, **401**, 189.
- WILLSTÄTTER R., MALISSON H., 1915. Über Variationen der Blütenfarben. *Liebig's Ann. Chem.*, **408**, 147.
- WILLSTÄTTER R., NOLAN, 1915. Über den Farbstoff der Päonie. *Ann. Chemie*, **408**, 136.
- WILLSTÄTTER R., ZOLLINGER E., 1914-1915. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. *Liebig's Ann. Chem.*, **408**, 83.
- WILLSTÄTTER R., ZOLLINGER E., 1916. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. *Liebig's Ann. Chem.*, **412**, 195.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1963

BATZ (B. de). — Signification et interprétation des résultats de germination	103
BÉNARD (P.), JOURET (C.). — Essais comparatifs de vinification en rouge ..	85
BÉNARD (P.), JOURET (C.), FLANZY (M.). — Influence des porte-greffes sur la composition minérale des vins	277
BERGERET (J.). — Action de la gélatine et de la bentonite sur la couleur et l'astringence de quelques vins	15
BIDAN (P.), MORFAUX (J. N.). — Méthode de conservation par congélation des bactéries thermophiles.	59
BIOL (H.), FOULONNEAU (C.). — Décoloration des vins rouges par certains sels de métaux lourds	27
BIZEAU (C.). — Étude des facteurs limitant la croissance des levures dans les moûts de « Clairette » et de « Muscat blanc à petits grains »	247
CHAUVET (J.), BRÉCHOT (P.), DUPUY (P.), CROSON (M.) et IRRMANN (R.). — Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange	237
DEIBNER (L.), BOURZEIX (M.). — Dispositifs pour la préparation rapide des chromatogrammes à développements radial et classique	141
DEIBNER (L.), MOURGUES (J.). — Détection des ferrocyanures et de l'acide cyanhydrique dans les jus de raisin et les vins au moyen de la réaction de MOIR	177
DEIBNER (L.). — État actuel de nos connaissances sur les acides cétoniques des vins	229
DEIBNER (L.), BOURZEIX (M.). — Sur l'extraction des composés polyphénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb	287
DUPUY (M.), MAUGENET (J.). — Métabolisme de l'acide lactique par <i>Acetobacter rancens</i>	5
FLANZY (M.), JOURET (C.). — Contribution à l'étude des eaux-de-vie d'Armagnac par chromatographie en phase gazeuse	39
FLANZY (M.), OURNAC (A.). — Fermentation des jus de raisins frais et désulfités. Influence d'additions de levures et de thiamine	65
LENOIR (J.). — Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté	51
MARTEAU (G.), SCHEUR (J.), OLIVIERI (C.). — Le rôle des enzymes pectolytiques du raisin ou de préparations commerciales dans le processus de la clarification des jus	155
ROSSET (R.). — Rôle des acides nucléiques dans la synthèse des protéines ..	203

Le Directeur-Gérant: M. L. CAGNAC

Impression Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 23-1-1964.

Dépôt légal: 1^{er} trimestre 1964. N° d'impression: 1360.